

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 4 月 5 日 (05.04.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/23545 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/11, 15/10, A01K 67/027, A61K 48/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/06686
- (22) 国際出願日: 2000 年 9 月 28 日 (28.09.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願平 11/280210 1999 年 9 月 30 日 (30.09.1999) JP  
特願平 11/346727 1999 年 12 月 6 日 (06.12.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 住友製薬株式会社 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒541-8510 大阪府大阪市中央区道修町二丁目2番8号 Osaka (JP).
- (71) 出願人 および  
(72) 発明者: 斎藤 泉 (SAITO, Izumu) [JP/JP]; 〒151-0053 東京都渋谷区代々木二丁目37番15-412号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 鐘ヶ江裕美 (KANEKAE, Yumi) [JP/JP]; 〒141-0031 東京都品川区西五反田八丁目10番14-1405号 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 弁理士 細田芳徳 (HOSODA, Yoshinori); 〒540-0012 大阪府大阪市中央区谷町二丁目8番1号 大手前M2ビル 細田国際特許事務所内 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
--- 国際調査報告書  
--- 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: DNA CONTAINING VARIANT FRT SEQUENCES

(54) 発明の名称: 変異型 FRT 配列を含有してなる DNA

(57) Abstract: DNA containing variant FRT sequences each undergoing a recombination reaction not with wild type FRT sequences but with the variant FRT sequence of the same sequence in the presence of recombinase FLP; a method of performing highly efficient gene insertion or gene replacement, etc. Namely, DNA containing variant FRT sequences (SEQ ID NOS:2 to 5); DNA containing at least one base replacement in a domain excluding the spacer domains of the above sequences and containing variant FRT sequences which (A) do not undergo any specific DNA recombination reaction with wild type FRT sequences in the presence of recombinase FLP, but (B) undergo a specific DNA recombination reaction with another variant FRT sequence having the same sequence; a cell transformed by the above DNA; a gene replacement method wherein the above DNA is used in the presence of recombinase FLP; a transgenic animal having the above DNA on its chromosome; drugs containing the above DNA; and a method of specific DNA recombination characterized by using two variant FRT sequences (SEQ ID NO:32) and performing a specific DNA recombination reaction in the presence of recombinase FLP.

[続葉有]

WO 01/23545 A1



(57) 要約:

リコンビナーゼFLPの存在下、野生型FRT配列とは組換え反応が起きないが、同一配列の2つの変異型FRT配列間で組換え反応が起こる変異型FRT配列を含有したDNA；並びに効率の高い遺伝子挿入若しくは遺伝子置換を行う方法等を提供すること。変異型FRT配列（それぞれ配列番号：2～5）を含有したDNA；該配列のスペーサー領域を除く領域において少なくとも1個の塩基の置換を有し、（A）リコンビナーゼFLPの存在下で野生型FRT配列との間で特異的DNA組換え反応が起こらず（B）リコンビナーゼFLPの存在下、同一の配列を有するもう1つの変異型FRT配列との間で特異的DNA組換え反応が起こる変異型FRT配列を含有したDNA；該DNAにより形質転換された細胞；該DNAをリコンビナーゼFLPの存在下に用いる遺伝子置換法、該DNAを染色体上に有したトランスジェニック動物；該DNAを含有した医薬；並びに2つの変異型FRT配列（配列番号：32）を用い、リコンビナーゼFLPの存在下に特異的DNA組換え反応を行うことを特徴とする、特異的DNA組換え方法。

## 明細書

## 変異型F R T配列を含有してなるDNA

## 技術分野

本発明は、変異型F R T配列を含有したDNAとその応用に関する。さらに詳しくは、野生型F R T配列とは特異的組換え反応は起こさないが変異型同士では特異的組換え反応を起こす変異型F R T配列と、該変異型F R T配列を用いた遺伝子置換方法並びに特異的DNA組換え方法に関する。

## 背景技術

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の2ミクロンDNAによりコードされるリコンビナーゼF L Pは、F R T配列と呼ばれる34塩基の特定のDNA配列を認識し、2つのF R T配列間でDNA鎖の切断、鎖の交換と結合の全行程を行なう部位特異的なDNA組換え酵素である (Babineau et al., J. Biol. Chem., Vol. 260, 12313-12319 (1985))。同一DNA分子上に同方向の2つのF R T配列が存在する場合は、リコンビナーゼF L Pによりその間に挟まれたDNA配列が切り出されて環状分子となり (切り出し反応)、またその逆に、異なるDNA分子上に2つのF R T配列が存在し、その一方が環状DNAである場合は、F R T配列を介して環状DNAが他方のDNA分子上に挿入される (挿入反応)。

挿入反応と切り出し反応は可逆的であるが、挿入反応により同一DNA分子上に2つのF R T配列が存在すると、ただちに切り出し反応も起こるため、反応の平衡は切り出し反応側に偏っている。従って、挿入反応により任意のDNAを他のDNA分子上に挿入できる頻度は極めて低いことが知られている。

F R T配列は34塩基のDNA配列からなり (Jayaram et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 82, 5875-5879 (1985))、2つの13塩基の逆方向反復配列 (inverted repeat) に挟まれた8塩基の配列はスペーサー領域と呼ばれ、DNA鎖の

組換えはスパーサー領域で行われることが知られている (Umlauf SW. et al., EMBO Journal, Vol.7. 1845-1852 (1988)、Lee J. et al., EMBO Journal, Vol.18. 784-791, 1999)。FRT配列(配列番号: 1)を示す。

5'-GAAGTTCCTATAC <sup>12345678</sup>TTTCTAGA GAATAGGAAGCTTC-3'  
スパー領域

このスペーサー領域の塩基を本来のF R T配列（野生型F R T配列）とは異なる塩基に変える（変異型F R T配列）ことにより、野生型F R T配列との間では特異的DNA組換え反応が起きないが、2つの変異型F R T配列間では特異的DNA組換え反応が起きることが発見された（Schlake T. et al., Biochemistry, Vol.33. 12746-12751（1994））。さらに、この変異型F R T配列を用い、動物由来培養細胞において、リコンビナーゼF L Pの存在下に異なる2つのDNA分子に存在する遺伝子を置換できることが示された。すなわち、あるDNA分子の変異型F R T配列と野生型F R T配列との間に存在する遺伝子Aを、他のDNA分子上に存在する変異型F R T配列と野生型F R T配列との間に存在する遺伝子Bと置換できることが示された（Schlake T. et al., Biochemistry, Vol.33. 12746-12751（1994）、Seibler J. et al., Biochemistry, Vol.36. 1740-1747（1997））。

F R T配列のスペーサー領域に変異を導入した既存の変異型F R T配列として、TATTTGAA (F3という) をスペーサー領域に有する配列 (配列番号: 6) が知られている (前述Seibler J. ら)。Seibler らは、この変異型F R T配列 (F3) と野生型F R T配列とを用い、動物細胞染色体での遺伝子置換を行なったが、置換前後の遺伝子に薬剤耐性遺伝子を用い、薬剤選択により遺伝子置換された細胞の濃縮を行なったにもかかわらず、遺伝子置換効率は21-38 %に過ぎなかった (Seibler J. et al., Biochemistry, Vol.37. 6229-6234 (1998))。薬剤選択を行わなければ、この遺伝子置換効率はさらに低下すると考えられる。すなわち、先行技術のF3の変異は、効率の良い遺伝子置換反応を行なうには不十分な配列であ



- (1) TCTCTGGA (f 2 1 6 1)
- (2) TCTCCAGA (f 2 1 5 1)
- (3) TATCTTGA (f 2 2 6 2) 及び
- (4) TTTCTGGA (f 6 1)

からなる群より選ばれた配列の塩基に置換された配列を有する変異型FRT配列  
(それぞれ配列番号: 2~5) を含有してなるDNA;

〔2〕 前記〔1〕に規定された変異型FRT配列において、スパーサー領域を除く領域において少なくとも1個の塩基の置換をさらに有する配列からなり、下記(A)及び(B)の性質を有する変異型FRT配列を含有してなるDNA:

(A) リコンビナーゼFLPの存在下でも野生型FRT配列との間で特異的DNA組換え反応が起こらない、及び

(B) リコンビナーゼFLPの存在下、同一の配列を有するもう1つの変異型FRT配列との間で特異的DNA組換え反応が起こる;

〔3〕 リコンビナーゼFLPの存在下でも、異なる配列を有するもう1つの変異型FRT配列との特異的DNA組換え反応が起こらない、前記〔1〕又は〔2〕記載の変異型FRT配列を含有してなるDNA;

〔4〕 少なくとも1つの野生型FRT配列と少なくとも1つの前記〔1〕~〔3〕いずれかに規定された変異型FRT配列とを含有してなるDNA;

〔5〕 野生型FRT配列と変異型FRT配列との間に所望の遺伝子を有してなる前記〔4〕記載のDNA;

〔6〕 互いに異なる配列をもつ少なくとも2つの前記〔3〕に規定された変異型FRT配列を含有してなるDNA;

〔7〕 互いに異なる配列をもつ2つの変異型FRT配列の間に所望の遺伝子を有してなる前記〔6〕記載のDNA;

〔8〕 前記〔4〕~〔7〕いずれかに記載のDNAにより形質転換された細胞;

〔 9 〕 下記のDNA (a) 及びDNA (b) をリコンビナーゼFLPの存在下に反応させ、下記のDNA (c) を得ることを特徴とする遺伝子置換方法：

DNA (a) ：野生型FRT配列、遺伝子A及び前記〔 1 〕～〔 3 〕いずれかに記載の変異型FRT配列をこの順に有するDNA；

DNA (b) ：野生型FRT配列、遺伝子B及びDNA (a) と同じ変異型FRT配列をこの順に有するDNA；

DNA (c) ：DNA (a) において、遺伝子Aが遺伝子Bに置換されたDNA；

ここで、遺伝子A及び遺伝子Bは互いに異なる任意の遺伝子である；

〔 1 0 〕 下記のDNA (d) 及びDNA (e) をリコンビナーゼFLPの存在下に反応させ、下記のDNA (f) を得ることを特徴とする遺伝子置換方法：

DNA (d) ：互いに異なる配列をもつ2つの前記〔 3 〕に規定された変異型FRT配列（それぞれ変異型FRT配列1及び変異型FRT配列2という）及び遺伝子Aを変異型FRT配列1、遺伝子A及び変異型FRT配列2の順に有するDNA；

DNA (e) ：変異型FRT配列1、遺伝子B及び変異型FRT配列2をこの順に有するDNA；

DNA (f) ：DNA (d) において、遺伝子Aが遺伝子Bに置換されたDNA；

ここで、遺伝子A及び遺伝子Bは互いに異なる任意の遺伝子である；

〔 1 1 〕 遺伝子Bが機能的な遺伝子ではないことを特徴とする、前記〔 9 〕又は〔 1 0 〕記載の方法；

〔 1 2 〕 遺伝子Aが機能的な遺伝子ではないことを特徴とする、前記〔 9 〕又は〔 1 0 〕記載の方法；

〔 1 3 〕 DNA (a) 若しくはDNA (d) が細胞の染色体DNAであり、DNA (b) 若しくはDNA (e) がプラスミドDNA又は二本鎖環状DNAウィ





## 図面の簡単な説明

第1図は、野生型F R T配列の合成DNAの構造を示す図である。(s)はセンス鎖(配列番号: 1 2)を、(a)はアンチセンス鎖(配列番号: 1 3)を示す。

第2図は、変異型F R T配列を含む合成したDNAの配列を示す。下線は、野生型から置換した塩基を示す。

第3図は、プラスミドpBxxAxxの構造を示す模式図である。太線部分はアデノウイルス由来であり、細線部分はpBR322由来である。「M」は変異型F R T配列を意味し、文字上の矢印はF R T配列の向きを示す。Ap<sup>R</sup>はアンピシリン耐性遺伝子、oriは大腸菌の複製開始起点を示す。

第4図は2つの同じ配列の変異型F R T間でのリコンビナーゼF L P依存組換え反応の測定法の原理を示す模式図である。太線部分はアデノウイルス由来であり、細線部分はpBR322由来である。

第5図は、プラスミドpBRFRTの構造を示す模式図である。「F」は野生型F R T配列を意味し、文字上の矢印はF R T配列の向きを示す。Ap<sup>R</sup>はアンピシリン耐性遺伝子、oriは大腸菌の複製開始起点を示す。

第6図は、プラスミドpBfwtAxxの構造を示す模式図である。太線部分はアデノウイルス由来であり、細線部分はpBR322由来である。「F」は野生型F R T配列を、「M」は変異型F R T配列を意味し、文字上の矢印はF R T配列の向きを示す。Ap<sup>R</sup>はアンピシリン耐性遺伝子、oriは大腸菌の複製開始起点を示す。

第7図は野生型F R T配列と変異型F R Tとの間でのリコンビナーゼF L P依存組換え反応の測定法の原理を示す模式図である。「F」及び白抜きの箱は野生型F R T配列を、「M」及び黒塗りの箱は変異型F R T配列を意味し、文字上の矢印はF R T配列の向きを示す。また、太線部分はアデノウイルス由来であり、細線部分はpBR322由来である。

第 8 図は、プラスミド pCAFNmFG の構築方法を示す模式図である。図中、wF は野生型 F R T 配列を、mF は変異型 F R T 配列を示す。また、C A G は C A G プロモーターを、GpA はグロビンポリ A 配列を、pA は、S V 40 のポリ A 配列を、Ad5 はヒトアデノウイルス 5 型ゲノムの一部を示す。

第9図は、野生型F R T配列と変異型F R T配列との間でのリコンビナーゼF L P依存組換え反応の原理を示す模式図である。図中、白抜きの矢印はF R T配列を、矢印は制限酵素F s p I部位を示す。また、数字はF s p I消化DNA断片の長さ(k b)を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明の変異型FRT配列を含有したDNAは、酵母2ミクロンDNA由来の  
下記の野生型FRT配列（配列番号：1）：

5'-GAAGTTCCTATAC TTTCTAGA GAATAGGAAGTTC-3'  
スパー領域

において、中央部の 8 塩基（スパーサー領域）の塩基が下記（１）～（４）：

- (1) TCTCTGGA (f 2 1 6 1)  
 (2) TCTCCAGA (f 2 1 5 1)  
 (3) TATCTTGA (f 2 2 6 2) 及び  
 (4) TTTCTGGA (f 6 1)

からなる群より選ばれた配列の塩基に置換された配列を有する変異型F R T配列（それぞれ、配列番号：2～5）を含有したDNAである。本発明のDNAは、前記（1）～（4）からなる群より選ばれた配列を含有するため、リコンビナーゼF L Pの存在下、野生型F R T配列とは組換え反応が起きないが、同一配列の2つの変異型F R T配列間では組換え反応が起こるという優れた性質を発現する。また、本発明のDNAによれば、より高い遺伝子置換効率で遺伝子置換を行なうことができる。

また、本発明の変異型F R T配列を含有したDNAは、単離DNAであってもよく、合成DNAであってもよい。

本発明において、「リコンビナーゼF L P」とは、酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)の2ミクロンDNAによりコードされ、2つのF L Pの認識配列(F R T配列)間の部位特異的組換え反応を行なう酵素をいう(Babineau et al., J. Biol. Chem., Vol. 260, 12313-12319 (1985))。リコンビナーゼF L Pにより、同一方向に配置された2つのF R T配列に挟まれた領域を切り出すことが可能である。

本発明において、「F R T配列」とは、配列番号: 1に示される34塩基からなるDNA配列(Jayaram et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 82, 5875-5879 (1985))をいう。「スペーサー領域」とは、前記F R T配列中の2つの逆方向反復配列(13bp)に挟まれた8塩基のDNA配列をいう。本明細書においては、この34塩基からなるF R T配列を特に「野生型F R T配列」と称する。

本発明において、「変異型F R T配列」とは、上記野生型F R T配列の少なくとも1つの塩基が他の塩基に置換されたDNA配列をいう。本発明において、「スペーサー領域を置換した変異型F R T配列」とは、野生型F R T配列の8塩基のスペーサー領域のうち少なくとも1つの塩基が他の塩基に置換されたDNA配列をいう。

本発明の変異型F R T配列を含有したDNAは、前述した変異型F R T配列のうち、野生型F R T配列とはF L P依存DNA組換え反応が起こらないが、同一配列の2つの変異型F R T配列間での組換え反応が起こる変異型F R T配列を含有したDNAである。従って、スペーサー領域だけでなく逆方向反復配列部の塩基がさらに置換されている変異型F R T配列であっても、上記性質を満たす限りは本発明の変異型F R T配列に含まれる。

すなわち、本発明の変異型F R T配列を含有したDNAには、変異型F R T配列において、スペーサー領域を除く領域において少なくとも1個の塩基の置換を

さらに有する配列からなり、下記（Ａ）及び（Ｂ）の性質：

（Ａ）リコンビナーゼＦＬＰの存在下でも野生型ＦＲＴ配列との間で特異的ＤＮＡ組換え反応が起こらない、及び

（Ｂ）リコンビナーゼＦＬＰの存在下、同一の配列を有するもう１つの変異型ＦＲＴ配列との間で特異的ＤＮＡ組換え反応が起こる、  
を有する変異型ＦＲＴ配列を含有したＤＮＡも含まれる。

かかるＤＮＡには、リコンビナーゼＦＬＰの存在下でも、異なる配列を有するもう１つの変異型ＦＲＴ配列との特異的ＤＮＡ組換え反応が起こらないという性質を有する配列を含有したＤＮＡも含まれる。

また、本明細書においては、変異型ＦＲＴ配列において、スペーサー領域を除く領域において塩基の欠失または挿入を有する配列からなるＤＮＡであっても、前記（Ａ）及び（Ｂ）の性質を有する配列を含有したＤＮＡも本発明の範囲に含まれる。

なお、本明細書においては、「野生型ＦＲＴ配列」と「変異型ＦＲＴ配列」とを包括的に、単に「ＦＲＴ配列」と称する場合がある。

本明細書において、「リコンビナーゼＦＬＰの存在下での特異的ＤＮＡ組換え反応」と「ＦＬＰ依存ＤＮＡ組換え反応」とは同じ意味であり、リコンビナーゼＦＬＰの存在する条件下に、２つのＦＲＴ配列を含有したＤＮＡの間で起こる、ＤＮＡ鎖の切断、ＤＮＡ鎖の交換と結合の全行程の反応のことをいう。

本発明の変異型ＦＲＴ配列を含有したＤＮＡとしては、例えば、少なくとも１つの野生型ＦＲＴ配列と少なくとも１つの前記変異型ＦＲＴ配列とを含有したＤＮＡ並びに互いに異なる配列をもつ少なくとも２つの前記変異型ＦＲＴ配列を含有したＤＮＡ等が挙げられるが、特にこれらに限定されるものではない。

かかるＤＮＡを用いて、２つのＦＲＴ配列の間、すなわちＦＲＴ配列とＦＲＴ配列との間に所望の遺伝子を有するＤＮＡを作製し、得られたＤＮＡを遺伝子置換法に用いることができる。かかるＤＮＡも本発明に含まれる。具体的には、野

生型F R T配列と変異型F R T配列との間に所望の遺伝子を有したDNA、互いに異なる2つの変異型F R T配列の間に所望の遺伝子を有したDNAが挙げられる。

前記「所望の遺伝子」は、特に制限はなく、タンパク質をコードする遺伝子や、プロモーターやポリA配列などの構造遺伝子、あるいはリンカー等の機能を有しない遺伝子であってもよい。

本明細書において、「遺伝子置換」とは、異なる2つのDNA分子上に存在する遺伝子を入れ換えることをいう。リコンビナーゼF L Pの存在下に、野生型F R T配列と変異型F R T配列とを用いて遺伝子置換を行なう方法の概念は、既存の文献（Schlake T. et al., Biochemistry, Vol.33, 12746-12751 (1994)）に開示されている。

本発明の変異型F R T配列を含有したDNAを用いた遺伝子置換法のDNA組換え反応効率は、本発明者らが開発した非常に鋭敏かつ直接的なin vitroのF L P依存DNA組換え反応効率の測定方法により測定することができる。

本測定方法の概略は、適当な長さのDNAに2つのF R T配列を挿入した基質DNAをリコンビナーゼF L P存在下に一定時間反応後、適当な制限酵素で消化し、電気泳動により分離したDNAバンドのサイズから反応効率を測定するものである。反応前の基質DNAバンドの量と組換え反応により生じたDNAバンドの量が直接比較できるため、DNA組換え反応効率を定量的に測定できる。すでに本発明者らは、同様の原理で他のリコンビナーゼであるP1ファージ由来のCre依存DNA組換え反応の効率を測定する方法を確立している（Lee, G. et al., Gene Vol.14, 55-65 (1998)）。以下に本測定方法を詳しく説明する。

まず、野生型F R T配列及びそのスペーサー領域を他の塩基に置換した変異型F R T配列を有するDNAを合成する。当該DNAを合成する方法としては、PCR法、部位特異的変異法など特に制限はないが、DNA合成機等を用いて化学的に相補的な一本鎖DNAを合成し、その後相補鎖をアニーリングし二本鎖DNA

として用いるのが望ましい。F R T配列を有するDNAは、34塩基のF R T配列を含んでいれば特に制限はないが、F R T配列以外に制限酵素の認識配列を含むことが望ましい。

次に、野生型又は変異型F R T配列を有する上記DNAを、適当な長さのDNA断片、例えばプラスミドpBR322を制限酵素消化して直鎖状にしたDNA断片の両端に連結し、両端に2つの野生型F R T配列もしくは、2つの同じ配列の変異型F R T配列を有する直鎖状DNA断片を調製する。次いで、このDNA断片に適当な長さのDNA断片、例えば、アデノウイルス由来のDNA断片を連結したプラスミドを作製し、これを制限酵素消化して直鎖状の基質DNAを調製する。また、野生型F R T配列を1つ有するプラスミドから、同様の方法により、野生型F R T配列と変異型F R T配列とを有する直鎖状の基質DNAを調製する。

リコンビナーゼF L Pを含む酵素溶液の調製法は特に制限はなく、リコンビナーゼF L Pを発現するように工夫された酵母、大腸菌等や、培養細胞などから調製できるが、リコンビナーゼF L Pを発現する組換えアデノウイルスを感染させた培養細胞の抽出液を用いることが好ましい。その理由は、組換えアデノウイルス感染細胞では、目的のタンパク質を大量に発現するからである。

以上の基質DNAとリコンビナーゼF L Pを含む酵素溶液とを一定時間反応させた後、反応液を適当な制限酵素で消化し、アガロース電気泳動で生じたDNAバンドを解析する。この測定方法では、未反応の基質DNA、組換え反応により生じたDNA、及び組換え反応の中間体DNAの量を直接比較できるため、2つの同じ配列の変異型F R T配列間、及び野生型F R T配列と変異型F R T配列との間での組換え反応の効率を定量的にかつ高感度に測定できる。

本発明者らは、F R T配列のスペーサー領域の2番目の塩基の変異と5～7番目の塩基の変異の組合せが特に重要との仮説を立て、f2161（配列番号：2）、f2151（配列番号：3）、f2262（配列番号：4）、f2272（配列番号：8）、f2373（配列番号：9）の5種類の変異型F R T配列を考案した。さらに、2塩

基置換との比較のため、1塩基のみ置換したf61変異型FRT配列（配列番号：5）も考案した。

次いで、前記6種類の変異型FRT配列に関して、同じ配列を有する2つの変異型FRT配列間での組換え反応の効率を、前記測定系で測定する。なお比較のため、先行技術の変異であるF3並びにその他の1塩基置換の2種類の変異型FRT配列（第2図参照）についても測定した。

先行技術であるF3の配列を有する変異型FRT配列の組換え効率は、野生型FRT配列の約65%であり、十分な組換え効率でないことが示された。一方、本発明のf2161とf2262の変異型FRT配列は、F3よりも高い組換え効率を示し、f2151とf61それぞれの組換え効率は、F3とほぼ同じかやや低いものの実用上十分に使用可能な効率であった。すなわち、f2161、f2262、f2151及びf6の各変異型FRT配列は、本発明の目的を達しうる変異型FRT配列である。また、配列公知のf72（配列番号：32）は、予想外の結果を示し、野生型FRT配列の2倍以上の組換え効率を示した。すなわち、f72は、野生型FRT配列よりも効率の高い、FLP依存DNA組換え反応の基質として用いることができる。

さらに、野生型FRT配列と変異型FRT配列間での組換え反応の効率を同様に測定することにより、野生型FRT配列とは特異的組換え反応は起こさないが変異型同士では特異的組換え反応を起こす変異型FRT配列を目的の変異型FRT配列として選択することができる。

本発明の変異型FRT配列を含有したDNAにより、遺伝子置換効率に優れた遺伝子置換方法が可能になる。かかる遺伝子置換方法も本発明に含まれる。

本発明の遺伝子置換方法としては、下記のDNA（a）及びDNA（b）をリコンビナーゼFLPの存在下に反応させ、下記のDNA（c）を得ることを特徴とする遺伝子置換方法（以下、「遺伝子置換方法1」という場合がある）：

DNA（a）：野生型FRT配列、遺伝子A及び本発明の変異型FRT配列をこの順に有するDNA；

DNA (b) : 野生型F R T配列、遺伝子B及びDNA (a) と同じ変異型F R T配列をこの順に有するDNA ;

DNA (c) : DNA (a) において、遺伝子Aが遺伝子Bに置換されたDNA ;

並びに

下記のDNA (d) 及びDNA (e) をリコンビナーゼF L Pの存在下に反応させ、下記のDNA (f) を得ることを特徴とする遺伝子置換方法（以下、「遺伝子置換方法2」という場合がある） :

DNA (d) : 互いに異なる配列をもつ2つの本発明の変異型F R T配列（それぞれ変異型F R T配列1 及び変異型F R T配列2 という）及び遺伝子Aを変異型F R T配列1、遺伝子A及び変異型F R T配列2 の順に有するDNA ;

DNA (e) : 変異型F R T配列1、遺伝子B 及び変異型F R T配列2 をこの順に有するDNA ;

DNA (f) : DNA (d) において、遺伝子Aが遺伝子Bに置換されたDNA ;

が挙げられる。ここで、遺伝子A 及び遺伝子B は互いに異なる任意の遺伝子である。また、遺伝子A 及び遺伝子B は、それぞれ、機能的な遺伝子ではないものでもよい。

本明細書において、「機能的な遺伝子でない」とは、構造遺伝子の既知の機能又は制御機能をもたないDNA配列であることを意味する。かかる例示としては、リンカー等が挙げられる。

本発明の遺伝子置換方法の具体例として、遺伝子置換方法1（野生型F R T配列と変異型F R T配列とを用いた方法）について説明するが、遺伝子置換方法2（変異型F R T配列1 と変異型F R T配列2 とを用いた方法）の場合も同様である。また、動物細胞の染色体の遺伝子を置換する場合を例として説明するが、本方法は動物細胞の染色体に限らず、動物ウイルスのゲノムや、植物細胞、酵母又



は細菌等の微生物の染色体や、バクテリオファージなどにも適用できる。

まず、動物細胞の染色体にあらかじめ野生型F R T配列と変異型F R T配列とを挿入しておく。野生型F R T配列と変異型F R T配列との間には任意の遺伝子Aが存在してよく、この場合は遺伝子置換となる。一方、遺伝子Aが存在しない場合には、遺伝子挿入となる。

一方、野生型F R T配列と変異型F R T配列とを挿入した環状DNA分子内の2つのF R T配列の間に、導入しようとする遺伝子Bを挿入しておく（野生型F R T配列／遺伝子B／変異型F R T配列と称す）。

この「環状DNA分子」は、例えば、プラスミドDNAや二本鎖環状DNAウイルスのようにあらかじめ環状である分子であってもよく、また常法により細胞内に導入後、細胞内で変換されることにより二本鎖環状DNAとなる性質を有する分子であってもよい。

前記野生型F R T配列／遺伝子B／変異型F R T配列を含む環状DNA分子を公知の方法により前述した細胞内に導入し、同時に公知の方法によりリコンビナーゼF L Pを細胞内で発現させることにより、環状DNA分子上の遺伝子Bが細胞の染色体上の野生型F R T配列と変異型F R T配列との間に挿入される。その際、細胞の染色体上の2つのF R T配列の間に遺伝子Aが存在する場合は、この遺伝子Aが除かれ遺伝子Bが挿入される遺伝子置換となる。染色体上の2つのF R T配列の間に遺伝子が存在しない場合には遺伝子挿入となる。さらに、環状DNAの2つのF R T配列の間に遺伝子が存在しない場合は、染色体上の遺伝子Aを除くこと（遺伝子欠失）ができる。また、遺伝子Aを除いても染色体上には2つのF R T配列は存在するので、2つのF R T配列の間に任意の遺伝子Cを有する別の環状DNA分子を用いることにより、再びこの染色体上の2つのF R T配列間に遺伝子を導入することができる。前記遺伝子挿入及び遺伝子欠失も本発明の遺伝子置換法の範囲に含まれる。

細胞にDNA分子を導入する方法としては、一般的に用いられている方法を使

用することができる。その例として、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム共沈殿法、DEAE-dextran法、リポフェクション法、遺伝子銃等の物理化学的方法、環状DNAウイルス等の生物学的方法等が挙げられる。

環状DNAウイルスとしては、用いる細胞の種類により異なるが、例えば、パピローマウイルスやSV40などが挙げられる。

細胞内に導入後、環状分子とする方法の例としては、リコンビナーゼを用いる方法が挙げられ、リコンビナーゼとしては、バクテリオファージP1由来のリコンビナーゼ Cre (Sternberg et al., J. Mol. Biol. Vol.150, 467-486 (1981))、チゴサッカロマイセス・ルーイのpSR1プラスミド由来のR (Matsuzaki et al., Mol. Cell. Biol. Vol.8, 955-962 (1988))、リコンビナーゼFLPなどが挙げられる。

細胞中の染色体にあらかじめ2つのFRT配列を挿入する場合、例えば、2つのFRT配列が存在するプラスミドDNA等を用いて細胞を形質転換すればよい。

形質転換時の遺伝子導入方法としては、前述した物理化学的方法が挙げられる。さらに、レトロウイルスやアデノ随伴ウイルス、HIV等の、ウイルスゲノムを細胞の染色体に挿入する性質を有するウイルスを用いてもよい。

動物細胞内でリコンビナーゼFLPを発現させる方法としては、リコンビナーゼFLPの遺伝子を保持したDNAやRNAを細胞に導入後、細胞内でリコンビナーゼFLPを発現させる方法（リコンビナーゼFLP遺伝子導入法）、リコンビナーゼFLPタンパク質そのものを細胞内に導入する方法（リコンビナーゼFLPタンパク質導入法）等が挙げられる。

リコンビナーゼFLP遺伝子導入法の例としては、FLPの遺伝子を保持したDNAやRNAを前述した物理化学的方法で細胞に導入する方法や、ウイルスベクターを用いる方法が挙げられる。ウイルスベクターとしては、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、ヘルペスウイルス、EBウイルスなどが挙げられるが、

その遺伝子導入効率の高さからアデノウイルスが好適である。

本発明の変異型F R T配列を含有したDNAを用いた細胞染色体上での遺伝子置換法の利点は、その効率の高さと染色体の特定の部位に遺伝子を挿入できることである。特に、染色体の特定部への遺伝子導入は、形質転換細胞を取得する上では極めて重要である。

その理由は、DNAを用いた通常の形質転換法（相同組換え以外の方法）や、レトロウイルスやアデノ随伴ウイルスなどのウイルスベクターを用いた従来の方法では、染色体上での目的遺伝子の挿入部位はランダムであるため、挿入部位により目的遺伝子の発現量及びその染色体での安定性に大きな差がある。したがって、例えば、目的遺伝子を安定に（長期間）、かつ高レベルでの発現が可能な形質転換細胞株を得るには、非常に多くの細胞株をスクリーニングする必要がある、しかも、1遺伝子ごとに、すなわち1回の形質転換ごとに、このスクリーニングを繰り返さなければならないという煩雑な操作を要する。それに対し、本発明による遺伝子置換方法によれば、2つのF R T配列に挟まれたある遺伝子の発現を指標にして、その発現量が高く安定な細胞株を一旦取得すれば、任意のどの遺伝子を導入しても、遺伝子の発現が高く安定な細胞株を容易に取得することができる。しかも、その効率は極めて高いため、通常必要な薬剤選択の操作が必要なく、細胞のクローン化の操作だけで目的の細胞株を短期間に取得することができる。対象とする細胞株に特に制限はないが、トランスジェニック動物の作製に用いるES細胞などの形質転換には、特に有効である。

本発明には、前記変異型F R T配列を含有したDNAにより形質転換された細胞も含まれる。

本発明の遺伝子置換方法は、培養細胞だけでなく動物個体に対しても適用される。特定の外来遺伝子を動物個体で発現させる方法として、トランスジェニック動物の技術がある。しかしながら、通常の方法でトランスジェニック動物を作製するには、まず目的遺伝子を発現するES細胞等を作製し、次いでこのES細胞等

を仮親の腹で発生させ、生まれた子どもについて目的遺伝子の発現を指標にスクリーニングし、さらに目的遺伝子を発現している動物個体をかけ合わせて初めて多数のトランスジェニック動物が得られるという複雑な操作が必要である。したがって目的の遺伝子を発現するトランスジェニック動物の作製には非常に時間がかかるという欠点を有する。通常これらの操作には半年から1年を要する。

本発明の遺伝子置換法を用いた場合、一旦遺伝子導入用のトランスジェニック動物を作製すれば、個々の遺伝子に応じたトランスジェニック動物の作製は不要となる。遺伝子導入用のトランスジェニック動物とは、染色体に変異型FRT配列と野生型FRT配列とを挿入した動物で、その作製は従来のトランスジェニック動物作製と同様の方法で行ない、薬剤による選択のため2つのFRT配列の間にネオマイシン耐性遺伝子等の薬剤耐性遺伝子を挿入してもおいてもよい。かかる遺伝子導入用動物に、DNA(a)：野生型FRT配列と変異型FRT配列との間に目的遺伝子を挿入したDNA、すなわち、野生型FRT配列、遺伝子A及び前記変異型FRT配列をこの順に有する環状DNAとリコンビナーゼFLPとを導入することにより、DNA(a)とリコンビナーゼFLPの両者が導入された組織や細胞で目的遺伝子が染色体に挿入され、その遺伝子を発現させることができる。動物個体へのDNA(a)とリコンビナーゼFLPとの導入は、リポソーム法やウイルスベクター、遺伝子銃など既存の方法で十分に行なうことができる。

本発明の方法を用いれば、異なる遺伝子を導入する場合でも、遺伝子に応じたDNA(a)を用いるだけでよく、非常に時間のかかるトランスジェニック動物の作製を行なう必要がない。本発明は、前記変異型FRT配列を含有したDNAを染色体上に有したトランスジェニック動物をも包含する。本発明のトランスジェニック動物は、本発明の変異型FRT配列を含有したDNAを染色体上に有しているため、種々の遺伝子の導入に汎用できるという優れた性質を有する。

さらに、DNA(a)とリコンビナーゼFLPとの両者を局所的に導入するだ

けで、目的の臓器や組織にのみ目的遺伝子を挿入することもできる。

本発明の遺伝子置換方法は、組換えウイルスの作製にも用いることができる。ウイルスとしてDNAウイルスが挙げられ、DNAウイルスとして、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、EBウイルス、サイトメガロウイルス等のヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、カナリアボックスウイルス等のボックスウイルス、昆虫のバキュロウイルス等が挙げられる。また、ウイルスとしてRNAウイルスが挙げられ、特にレトロウイルスの作製に好適である。

レトロウイルスベクターを作製する場合、力価の高いウイルス産生細胞を各遺伝子を産生するレトロウイルスベクターごとに選択しているが、本発明の遺伝子置換方法により、一度マーカー遺伝子を発現するウイルス高産生細胞株を樹立しておけば、この細胞株染色体上のマーカー遺伝子を目的遺伝子と置換することにより、高産生株を容易に得ることができると考えられる。

本発明の遺伝子置換方法による組換えウイルス作製の具体的な方法を、組換えアデノウイルスの作製を例として説明する。従来の技術での組換えアデノウイルスの作製方法は、アデノウイルスゲノム及び目的遺伝子を挿入したプラスミドベクターやコスミドベクター等で、293細胞などの細胞を形質転換し、相同組換えにより生じた組換えウイルスをクローン化後、目的のウイルスを選別し増殖させる方法であり、これには長期間の作業が必要である。

本発明の遺伝子置換方法による組換えウイルス作製によれば、効率の低い相同組換えを介さないため、短期間に目的の組換えウイルスを作製することができる。すなわち、変異型FRT配列と野生型FRT配列とを挿入した遺伝子導入用のアデノウイルスをまず作製しておき、次いでこのウイルスを293細胞など組換えアデノウイルス作製に適した細胞に感染させ、同時に野生型FRT配列と変異型FRT配列との間に目的遺伝子を挿入したプラスミドDNAを該細胞に導入するとともにリコンビナーゼFLPを発現させることにより、変異型FRT配列と野生型FRT配列との間に目的遺伝子が挿入された組換えウイルスが高頻度に得ら

れる。この場合、遺伝子導入用のアデノウイルスは、FLPによる組換えによりFRT配列には含まれたパッケージング配列が除去されるように作製し、プラスミドDNAから目的遺伝子と同時にパッケージング配列を加えて置換することにより、目的ウイルスが選択的に得られるようにするのが望ましい。リコンビナーゼFLPは、プラスミドDNAの形で導入してもよいし、またあらかじめ細胞を形質転換し、リコンビナーゼFLPを発現するようにしておいてもよい。

リコンビナーゼFLPを発現する形質転換細胞の例としては、リコンビナーゼFLPを恒常的に発現する細胞や、ある条件でリコンビナーゼFLPの発現を誘導する細胞が挙げられる。後者の例としては、薬剤などの存在下あるいは非存在下でリコンビナーゼFLPの発現を誘導する細胞や、プロモーターとFLP遺伝子との間にリコンビナーゼの認識配列—スタッファー(stuffer) DNA—リコンビナーゼの認識配列を挿入した細胞にリコンビナーゼを作用させることによりリコンビナーゼFLPの発現を誘導する場合が挙げられる。

リコンビナーゼ及びその認識配列の例としては、P1ファージ由来のリコンビナーゼCre とloxP配列が挙げられる。リコンビナーゼを作用させる方法としては、プラスミドDNA、リポソームなどを用いる遺伝子導入あるいはリコンビナーゼタンパク質そのものを導入する方法や、アデノウイルスベクターなどウイルスベクターを用いる方法が挙げられるが、アデノウイルスベクターを用いる方法が望ましい。

外来遺伝子Aが外来遺伝子Bに置換された組換えアデノウイルスを作製する場合について説明する。遺伝子導入用の組換えアデノウイルスの構造の例として、アデノウイルス左端逆方向反復配列 (inverted terminal repeat: ITR)、野生型FRT配列、パッケージング配列、野生型FRT配列、遺伝子A及び変異型FRT配列の順にFRT配列を挿入したアデノウイルスが挙げられる。ここで、野生型FRT配列／遺伝子Aの断片はE1欠失部位に挿入される。

外来遺伝子B挿入用プラスミドDNAの例としては、野生型FRT配列、パッ

ケーシング配列、遺伝子B及び変異型F R T配列の構造を有するプラスミドが挙げられる。これらの遺伝子導入用のアデノウイルスと外来遺伝子B挿入用プラスミドDNAとを同時に或いは順次、リコンビナーゼF L Pを発現させるようにした293 細胞などの細胞に導入すると、遺伝子導入用のアデノウイルスでは2つの野生型F R T配列に挟まれたパッケージング配列が除かれるとともに、野生型F R T配列、遺伝子A及び変異型F R T配列の部分がプラスミド由来の〔野生型F R T配列／パッケージング配列／遺伝子B／変異型F R T配列〕に置換された組換えアデノウイルスが生成する。遺伝子置換されなかった遺伝子導入用のアデノウイルスは、反応効率が高い2つの野生型F R T配列間の通常の「切り出し反応」によりパッケージング配列が除去されているため、ウイルスDNAは複製するもののウイルス粒子(virion)内にDNAがパッケージングされずウイルスとしては複製しない。一方、遺伝子置換されたアデノウイルスはパッケージング配列を有するため、ウイルスとして複製できるため、「遺伝子B」に置換された組換えアデノウイルスが高頻度に得られる。

遺伝子導入用のアデノウイルスの変異型F R T配列の挿入位置は、外来遺伝子Aの隣接部位であってもよいし、アデノウイルスゲノム上の遺伝子Aから離れた部位であってもよい。後者の挿入位置の例としては、L3遺伝子とE2A 遺伝子との間の非翻訳領域、E3遺伝子の欠失部位、E4遺伝子の上流域と右端ITR との間などが挙げられる。これらの位置に変異型F R T配列を挿入して遺伝子置換を行なう場合、生成するアデノウイルスDNAがウイルス粒子(virion)に効率よくパッケージングされるように、目的遺伝子挿入用プラスミドの野生型F R T配列／変異型F R T配列間のDNAのサイズを調節する必要があるが、遺伝子置換された組換えアデノウイルスはウイルスの複製に必須の遺伝子を欠失しているため、遺伝子治療用ベクターとして用いる場合、現在のアデノウイルスベクターで問題となっている副作用が軽減できると考えられる。

以上の方法を、さらに具体的に詳細に説明する。まず、293 細胞などアデ

ノウイルスE1A 遺伝子を発現しE1遺伝子を欠失した非増殖型アデノウイルスの増殖に好適な細胞を、〔プロモーター／loxP配列／薬剤耐性遺伝子／ポリA配列、loxP配列／F L P 遺伝子／ポリA配列〕の構造を有するDNAで形質転換し、リコンビナーゼCre 依存にF L P を発現する細胞株（Cre 依存F L P 発現細胞）を得る。ここで、薬剤耐性遺伝子は形質転換細胞株を選別するために必要であり、その例としてネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子などが挙げられる。また、プロモーターとしては、哺乳動物細胞で機能する限り特に限定されないが、その例として、CAG プロモーター（特開平3-168087号公報）、EF-1 $\alpha$ プロモーター（Gene, Vol.91, 217-223 (1990)）、SR $\alpha$ プロモーター（Molecular and Cellular Biology, Vol.8, 466-472 (1991)）等が挙げられる。さらに、リコンビナーゼF L P 遺伝子の5' 側又は3' 末端に核移行シグナル配列を接続させていてもよい。

遺伝子導入用組換えアデノウイルスは、Cre 依存F L P 発現細胞にリコンビナーゼCre を供給しF L P を発現させる役割を兼ね、左端ITR とパッケージング配列との間に野生型F R T 配列を挿入し、E 1 欠失部位に野生型F R T 配列とリコンビナーゼCre 発現単位（プロモーターとポリA配列を含む）をこの順になるよう挿入し、さらにL3遺伝子とE2A 遺伝子との間の非翻訳領域、E3遺伝子の欠失部位、E4遺伝子の上流域と右端ITR との間のいずれかの位置に変異型F R T 配列を挿入しておく。以下の例では、E4遺伝子の上流域と右端ITR との間に変異型F R T 配列を挿入した場合について説明する。左端ITR とパッケージング配列との間の野生型F R T 配列の挿入部位に特に制限はないが、ヒトアデノウイルス5型の塩基配列で143 ～148 位に挿入するのが好ましい。プロモーターとしては、哺乳動物細胞で機能する限り特に限定されないが、その例として、前述したCAG プロモーター、EF-1 $\alpha$ プロモーター、SR $\alpha$ プロモーター等が挙げられる。さらに、リコンビナーゼCre 遺伝子配列の5' 側又は3' 側の末端に核移行シグナル配列を接続させていることが好ましい。これは、細胞質で合成されたりコンビナーゼCre が



その認識配列であるloxP配列を有するDNAに効果的に作用するには、核内に移行する必要があり、核移行シグナル配列はこれを促進する（Daniel Kalderon ら、Cell. 39、499-509（1984））からである。核移行シグナル配列を有するCre 遺伝子は、プラスミドpSRNCre（Kanegae Y. et al., Nucleic Acid Res., Vol. 23, 3816-3821（1995））等から得ることができる。

外来遺伝子挿入用プラスミドの例としては、〔野生型F R T配列／パッケージング配列／遺伝子Bの発現単位／変異型F R T配列〕の構造を有するプラスミドが挙げられる。ここで野生型F R T配列とパッケージング配列との間のDNA配列に特に制限はないが、遺伝子導入用組換えアデノウイルスと同じDNA配列を有するのが望ましい。

前述したCre 依存F L P発現細胞に遺伝子導入用組換えアデノウイルスを感染させるとともに、外来遺伝子挿入用プラスミドで形質転換すると、まず遺伝子導入用組換えアデノウイルスにより発現したCre タンパク質により、Cre 依存F L P発現細胞の2つのloxP配列の間の薬剤耐性遺伝子とポリA配列が除かれ、リコンビナーゼF L Pが発現する。次いでリコンビナーゼF L Pの作用により、Creを発現する遺伝子導入用組換えアデノウイルスの2つの野生型F R T配列に挟まれたパッケージング配列が除かれるとともに、遺伝子導入用組換えアデノウイルスの野生型F R T配列と変異型F R T配列との間のCre 発現単位とアデノウイルスゲノムの大部分（L1遺伝子からL5遺伝子まで）が、外来遺伝子挿入用プラスミドの〔野生型F R T配列／パッケージング配列／遺伝子Bの発現単位／変異型F R T配列〕と置換される。従って、遺伝子置換により生じたアデノウイルスは、〔左端ITR ／F R T配列／パッケージング配列／遺伝子Bの発現単位／変異型F R T／右端ITR〕の構造となり、アデノウイルスゲノムの大部分を欠失しているため、このウイルス単独では増殖できない。一方、遺伝子置換しなかった遺伝子導入用組換えアデノウイルスは、パッケージング配列が除かれているため、そのゲノムDNAが複製しアデノウイルスの増殖に必須のタンパク質を産生するもの

の、そのゲノム自体は感染性ウイルス粒子にパッケージングされないため、ウイルス自体は増殖せずヘルパーウイルスとして作用する。その結果、遺伝子置換により生じたアデノウイルスは、このヘルパーウイルスが産生するアデノウイルスタンパク質によりそのゲノムDNAが複製するとともに、正常なパッケージング配列を有しているため感染性ウイルス粒子にパッケージングされウイルスとして選択的に増殖する。従って、この一連の反応で生じた組換えアデノウイルスの大部分は、遺伝子置換され、かつアデノウイルスゲノムの大部分を欠失した目的アデノウイルスであることが期待される。

さらに前記f72により、酵母2ミクロンDNA由来の下記の野生型配列（配列番号：1）：

5'-GAAGTTCCTATAC <sup>12345678</sup>TTTCTAGA GAATAGGAAGCTTC-3'  
スベーター領域

において、スパーサー領域の 7 番目の塩基に G から C への置換を有する 2 つの変異型 F R T 配列（配列番号：32）を用い、リコンビナーゼ F L P の存在下に特異的 DNA 組換え反応を行なう、特異的 DNA 組換え方法が提供される。

本発明の変異型FRT配列を含有したDNAは、医薬として遺伝子治療にも用いることができる。本発明の医薬は、本発明のDNAを含有しているため、効率よく、染色体への遺伝子を挿入及び除去ができるという優れた性質を有する。本発明の医薬の遺伝子治療への適用を以下に説明する。

まず、ヒト細胞の染色体に変異型F R T配列と野生型F R T配列とをあらかじめ挿入する。そのために、変異型F R T配列と野生型F R T配列とを有するDNAが医薬として用いられる。該DNAは、例えば、レトロウイルスやアデノ随伴ウイルス(AAV)などのウイルスベクター中に含まれる形で投与される。なかでも、レトロウイルスによる遺伝子導入は、染色体にランダムに挿入されるが、AAVでは染色体の特定の部位(第19番染色体のAAV-S1領域)に挿入される確率が高いという観点から、AAVを使用することが好ましい。この染色体の特定部位への遺

伝子導入にはAAV がコードするウイルス遺伝子(Rep) が必須であるが、現在用いられているAAV ベクターではAAV 遺伝子の大部分が除かれているため、染色体への特異的組み込み機構は失われている。しかし、変異型F R T配列と野生型F R T配列とを合わせてもわずか100 塩基足らずであるため、AAV の全ウイルス遺伝子を保持したまま、2つのF R T配列を挿入したウイルスを作製できる。その挿入位置は、AAV 遺伝子の両端に存在する逆方向反復配列 (inverted terminal repeat : ITR ) の各々すぐ内側が望ましい。この2つのF R T配列を挿入したAAV をヒトに投与することにより、染色体に2つのF R T配列を挿入することができる。

次いで、野生型F R T配列と変異型F R T配列との間に目的遺伝子を挿入した環状DNA分子を含有した医薬と、リコンビナーゼF L Pタンパク質又はF L P遺伝子を保持したDNAを投与することにより、染色体上に存在する2つのF R T配列の間に挟まれたAAV 遺伝子が除かれ、目的遺伝子に置換される。

本発明の医薬は、有効成分であるDNA分子を安定な状態に保持するための成分、例えば、緩衝成分、分解保護剤（例えば、核酸分解酵素の阻害因子など）などを適宜含有してもよい。また、本発明の医薬は、細胞及び／又は組織への導入に適した薬剤をさらに含有してもよい。

医薬としての環状DNA分子とリコンビナーゼF L PもしくはF L P遺伝子を保持したDNA分子をヒト細胞に導入する方法としては、ウイルスベクターやリポソームベクターなど既存の遺伝子治療に用いられているベクターを用いる方法が挙げられる。

本発明の医薬を遺伝子治療に用いる場合、患者への投与方法としては、該医薬を直接体内に導入する *in vivo* 法、及び、ヒトからある種の細胞を取り出して体外で該医薬を該細胞に導入し、その細胞を体内に戻す *ex vivo* 法がある（日経サイエンス, 1994 年4 月号, 20-45頁、月刊薬事, 36(1), 23-48, 1994、実験医学増刊, 12(15), 1994、日本遺伝子治療学会編遺伝子治療開発研究ハンドブッ

ク、エヌ・ティー・エス,1999)。

*in vivo*法により投与する場合は、本発明の医薬を、例えば、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内などに投与するか、対象となる組織に直接投与することができる。

具体的には、例えば、実験手引書などにその調製法、投与法などが詳しく解説されている(別冊実験医学, 遺伝子治療の基礎技術, 羊土社,1996、別冊実験医学, 遺伝子導入&発現解析実験法, 羊土社,1997、日本遺伝子治療学会編遺伝子治療開発研究ハンドブック, エヌ・ティー・エス,1999)。

このようにして染色体に遺伝子が挿入されたヒト細胞では、目的遺伝子の両端に変異型FRT配列と野生型FRT配列が存在し、さらにその外側にAAVのITRが存在するのみで、AAVの構造遺伝子は存在しないため、AAV由来のタンパク質が発現し抗原となることもなく、目的遺伝子の発現が長期間安定に持続することが期待できる。また、挿入した遺伝子が不要になった場合、野生型FRT配列と変異型FRT配列の間に遺伝子が存在しない環状DNA分子を投与することにより、挿入した遺伝子を染色体から除くことができる。さらに、その後再び染色体への遺伝子の挿入が必要になった場合、2つのFRT配列が染色体上に残っているため、前述した方法で任意の遺伝子を挿入することができる。このように、本発明の変異型FRT配列をもつDNAは、染色体への遺伝子を挿入及び除去が自由にできる遺伝子治療のための医薬として用いることができる。

また、基質特異性の異なる三つ以上のFRT配列を用いることにより、遺伝子置換方法の応用範囲をさらに広げることが可能である。基質特異性の異なる三つのFRT配列の組み合わせとして、例えば、野生型FRT配列と2つの変異型FRT配列、三つの変異型FRT配列等が挙げられる。本方法を、野生型FRT配列、変異型FRT配列1、変異型FRT配列2の三つの異なるFRT配列が同一DNA上に存在する場合を例として説明する。野生型FRT配列、遺伝子A、変異型FRT配列1、遺伝子B及び変異型FRT配列2をこの順に有するDNA(

a) に、野生型 F R T 配列、遺伝子 C 及び変異型 F R T 配列 1 を有する環状 DNA (b) とをリコンビナーゼ F L P の存在下に反応させると、DNA (a) 中の遺伝子 A を遺伝子 C に置換することができる。一方、環状 DNA (b) の代わりに、変異型 F R T 配列 1、遺伝子 D 及び変異型 F R T 配列 2 をこの順で有する環状 DNA (c) とをリコンビナーゼ F L P の存在下に反応させると、DNA (a) 中の遺伝子 B を遺伝子 D に置換することができる。すなわち、異なる環状 DNA を用いるだけで、DNA (a) に存在する複数の遺伝子のうち目的の遺伝子のみを任意の遺伝子に置換することができる。

以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではなく、本発明の技術分野における通常の変更ができることは言うまでもない。なお、実施例中のフェージ、プラスミド、DNA、各種酵素、大腸菌、培養細胞等を取り扱う諸操作は、特に断らない限り、「Molecular Cloning, A Laboratory Manual, T. Maniatis ら編、第 2 版 (1989), Cold Spring Harbor Laboratory」に記載の方法に準じて行なった。

## 実施例 1

### <リコンビナーゼ F L P を含む細胞抽出液の調製>

#### (1) リコンビナーゼ F L P 発現組換えアデノウイルスの作製

リコンビナーゼ F L P の翻訳開始コドンの前後の塩基配列を K o z a k 配列に合わせたプラスミドを得るため、以下の操作を行なった。

(a) プラスミド pUCFLP は、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の 2 ミクロン DNA (6 3 1 8 b p : James et al., Nature, Vol. 286, 860-865 (1980)) の S p h I 部位 (5 5 6 8 番目) から X b a I 部位 (7 0 3 番目) までの F L P 遺伝子全長を含む断片 (1 4 5 7 b p) が、プラスミド pUC19 の S p h I - X b a I 部位間に挿入されたプラスミドである。pUCFLP を X b a I 及び S p h I で消化し、F

L P 遺伝子全長を含む約 1.5 kb の断片を得た。

(b) 5' 末端突出側が H i n d III 切断部位と、もう一方の末端が S p h I 切断部位と結合可能で、かつ翻訳開始コドンの上流に P s t I 部位を有する以下の配列の合成 DNA アダプターを調製した。

5'-AG CTT CTG CAG CAG ACC GTG CAT CAT G-3' (配列番号: 10)

3'-A GAC GTC GTC TGG CAC GTA-5' (配列番号: 11)

(a) 及び (b) の両 DNA を pUC19 の H i n d III - X b a I 部位間に挿入し、プラスミド pUKFLP (4.1 kb) を得た。

pUKFLP を P s t I 及び F s p I で消化後平滑化した F L P コード領域を含む 1.4 kb の断片を、コスミドベクター pAxCAwt のプロモーターとポリ A 配列との間の S w a I 部位に挿入し、コスミドベクター pAxCAFLP を得た。

pAxCAFLP と アデノウイルス DNA-末端タンパク質複合体とを既知の方法 (Miyake et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.93, 1320-1324 (1996) 及び特開平 7-298877 号公報) に従いリン酸カルシウム共沈法で 293 細胞を形質転換し、目的の F L P 発現組換えアデノウイルス AxCAFLP (E1 及び E3 遺伝子欠失) を得た。

## (2) リコンビナーゼ F L P を含む細胞抽出液の調製

リコンビナーゼ F L P 依存組換え反応に用いる F L P を含む細胞抽出液を得る目的で以下の操作を行なった。AxCAFLP (約  $1 \times 10^9$  PFU) を、225cm<sup>2</sup> フラスコ 1 本の 293 細胞 (ヒト胎児腎臓由来細胞株) に感染 (37°C、1 時間) させ、培地 (5% FCS 含有 DMEM 培地) を添加後さらに 24 時間培養した。培養終了後、低速遠心機で 1000 回転 5 分遠心し、培養上清を捨て細胞を集めた。細胞に保存用緩衝液 [10% グリセロール / 20mM トリス塩酸 (pH7.5) / 300mM 塩化ナトリウム / 1mM EDTA (pH7.5)] 1ml を加え細胞を懸濁し、密閉型ソニケーターで 200W、3 分 (30 秒 x 6 回) 細胞を破碎し、細胞内に存在するリコンビナーゼ F L P を放出させた。得られ

た細胞破碎液を高速遠心機で10,000回転20分遠心し、その上澄に最終濃度0.1mMとなるようPMSF（フェニルメチルスルフォニルフロライド）を加え冷凍保存（-80°C）した。

## 実施例 2

### <変異型F R T配列を含む基質DNAの調製>

#### （1）変異型F R T配列を含む合成DNAの作製

野生型F R T配列の8塩基のスペーサー部分を他の塩基に置換した変異型F R T配列を含む52塩基の合成DNAを作製した。また同時に野生型F R T配列を含む52塩基の合成DNAも作製した。野生型F R T配列の合成DNAの構造を第1図（センス鎖は配列番号：12、アンチセンス鎖の配列番号：13）に、変異型F R T配列を含む9種類の合成DNAの配列（センス鎖及びアンチセンス鎖）及び該野生型F R T配列の合成DNAの配列を第2図に示す。

野生型センス鎖とアンチセンス鎖は相補配列ではなく、各々の鎖をアニーリングし二本鎖DNAとした際、5'末端がそれぞれ4塩基突出し、各々の末端が制限酵素XhoI及びSpeIの消化断片になるように設計した。そのため、これらの二本鎖DNAは、XhoI断片側は制限酵素XhoI及びSalI消化断片と、SpeI断片側は制限酵素SpeI及びNheI消化断片と結合できる。

全ての一本鎖合成DNAは、5'末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化し、それぞれの変異に対応するセンス鎖及びアンチセンス鎖をアニーリングした。以後、この二本鎖合成DNAを変異型F R T合成DNAと呼ぶ。

#### （2）2つの野生型F R T配列もしくは2つの同じ配列の変異型F R T配列を含む基質DNAの調製

直鎖状DNAの両端に同じ配列の変異型F R T配列を有する基質DNAを得る目的で、以下の操作を行なった。

プラスミド pBR322 を制限酵素 NheI 及び SalI で同時に消化し、野生型 F R T 又は変異型 F R T 合成 DNA 9 種類をそれぞれライゲーション反応（プラスミド：合成 DNA のモル比 1：20）を行なった後、制限酵素 XhoI 及び SpeI で同時に消化した。この制限酵素消化により pBR322 DNA の両端に複数個結合した野生型もしくは変異型 F R T 合成 DNA が除かれ、pBR322 DNA の両端に野生型もしくは同じ配列の変異型 F R T 合成 DNA が各一ヶ所ずつ結合した約 4.1kb の直鎖状 DNA が生じる。次いでこれら反応物をアガロース電気泳動し、約 4.1kb のバンドをゲルから切り出した後 GEANCLEAN II（BI0101 社製）により精製した。この操作により、pBR322 DNA の両端に 2 つの野生型 F R T 配列もしくは 2 つの同じ配列の変異型 F R T 配列が結合した直鎖状 DNA 断片を得た。

この断片にアデノウイルス 5 型由来の DNA 断片を結合したプラスミドを構築するため、以下の操作を行なった。

アデノウイルス 5 型の E1 及び E3 遺伝子以外のほぼ全長が挿入されたコスミドベクター pAxcw（特開平 8-308585 号公報 15 頁）を制限酵素 XbaI 及び XhoI で同時に消化し、生じた DNA 断片のうちの 3.8kb の断片（アデノウイルス 5 型塩基配列 24,796 - 28,592 番目）を単離した。この 3.8kb の断片と、前述した pBR322 DNA の両端に同じ配列の F R T 合成 DNA が結合した DNA 断片とをリガーゼで結合すると、制限酵素 SpeI 断片と XbaI 断片とが結合した結果、環状化した。この DNA で大腸菌を形質転換し、2 つの野生型 F R T 配列もしくは 2 つの同じ配列の変異型 F R T 配列を有するプラスミド pBxxAxx（7.9kb、第 3 図）を得た。なお、pBxxAxx は同じ配列の 2 つの F R T 配列を有するプラスミドの総称で、例えば、F R T 配列が野生型の場合は pBfwtAfwt と、F3 の場合は pBF3AF3 と、f2161 の場合は pBf2161Af2161 と称する。

pBfwtAfwt 並びに変異型 F R T 配列を含む 9 種類のプラスミドを制限酵素 DraI で消化し、次に示す F L P 依存 DNA 組換え反応の基質 DNA として用いた。



## 実施例 3

< 2つの同じ配列の変異型F R T配列間でのF L P依存DNA組換え反応 >

以下に示すアッセイ方法で、2つの変異型F R T配列間でF L P依存組換え反応が起きるかどうかを検討した。終濃度、50mM トリス塩酸(pH7.5) / 10mM MgCl<sub>2</sub> / 5mM DTT を含む緩衝液に、実施例 2 で調製したDraI消化済みプラスミドDNA (1.5  $\mu$ g) と実施例 1 で調製したF L Pを含む細胞抽出液25  $\mu$ l を加え(反応液量50  $\mu$ l)、30°Cで30分反応した。反応終了後、反応液に200  $\mu$ l の滅菌水及び50  $\mu$ l の20mM EDTA 溶液(pH8.0)を加え、フェノール/クロロホルム抽出並びにクロロホルム抽出を行ない、さらにエタノール沈殿し、得られたDNAをRNaseA(20  $\mu$ g/ml)を含むTEバッファー(pH8.0) 20  $\mu$ l に溶解した。次いで、その全量を制限酵素NcoI消化し、アガロースゲル電気泳動後、臭化エチジウム(EtBr) 染色により検出されたDNAのバンドを解析した。

基質DNAには制限酵素NcoIサイトが1ヶ所のみ存在するので、F L Pによる組換え反応を行わないDraI消化済みの基質DNA (7.2kb と0.7kb)を制限酵素NcoI消化すると、5.9kb、1.3kb に0.7kb を加えた3本のバンドが生じる。一方、基質DNAがF L Pにより組換え反応を起こすと、変異型F R Tを1個有する約3.8kb の環状DNAと変異型F R Tを1個有する約3.4kb の直鎖状DNAが生じるので、これらを制限酵素NcoI消化すると、前記3.8kb 及び3.4kb のバンドに0.7kb のバンドを加えた3本のバンドが生じる(第4図参照)。従って、3.8kb 及び3.4kb のバンドはF L Pによる組換え反応が起きたことを示し、5.9kb 及び1.3kb のバンドはF L Pによる組換え反応が起きていないことを示すので、これらのバンドの量比により組換え反応の効率が分かる。

なお、反応効率を数値化するため、3.8kb 及び3.4kb のバンドのDNA量の合計に対する反応系の全DNA量の比を、2つのF R T配列間の組換え率(%)として算出した。

本測定方法における野生型F R T配列間の組換え率は4.8%で、先行技術である

F3の変異型F R T配列間の組換え率は3.1%と、野生型F R T配列より明らかに低い値であった。それに比べ、f2161の組換え率は4.5%、f2262の組換え率は3.8%と、いずれもF3よりも高い組換え率を示した。また、f2151は2.9%、f61は2.6%とF3よりやや低い組換え率であり、f2272とf2273のそれぞれの組換え率は0であった。さらに、公知配列f72の組換え率は10.9%であり野生型の2倍以上であった。

以上の結果より、本発明のf2161及びf2262の変異型F R T配列は、先行技術であるF3の変異型F R T配列よりも組換え効率の点で優れており、また、f2151とf61はF3とほぼ同程度の反応効率であることが示された。

#### 実施例 4

<野生型F R T配列と変異型F R T配列との間でのF L P依存DNA組換え反応>

##### (1) 野生型F R T配列を1つ有するプラスミド(pBRFRT)の構築

プラスミドpBR322に野生型F R T配列が1つ挿入されたプラスミド(pBRFRT)を構築するため、以下の(a)及び(b)の操作を行なう。

(a) プラスミドpBR322の制限酵素NheIサイトからEcoNI サイト間の約0.4kbの断片を、XhoIリンカーを用いて野生型loxP配列を含むDNAに置換したプラスミドpBRwt (Lee, G. et al., Gene Vol.14, 55-65 (1998))を制限酵素XhoIで消化する。この断片と実施例2-(1)で作製した野生型F R T配列を含む52塩基の合成DNAとをライゲーション後、制限酵素SpeI及びPstIで同時に消化し、pBR322 DNAの両端に複数個結合した野生型F R T合成DNAを除く。次いで反応物をアガロース電気泳動し、約3kbのバンドをゲルから切り出し、野生型F R Tを1つ含む約3.0kbの断片を得る。

(b) プラスミドpBR322を制限酵素PstI及びNheIで同時に消化後、アガロース電気泳動し、生じた2本のDNAバンドのうち約1.0kbの断片を回収する。

(a) 及び (b) で調製した両DNAをライゲーションし、pBR322のNheIサイトとEcoNI サイトとの間に野生型F R T配列が1つ挿入されたプラスミドpBRFRT (4.4kb、第5図)を得る。

## (2) 野生型F R T配列と変異型F R T配列とを含むプラスミドの構築並びに基質DNAの調製

プラスミドpBRFRTの野生型F R T配列から約30bp離れた位置にSalIサイトが存在するので、pBRFRTを制限酵素SalIで消化し直鎖状にした後、実施例2-(1)で作製した変異型F R T配列を含む52塩基の合成DNA (9種類)を各々ライゲーションする。この操作によりpBRFRTのSalI消化部位に変異型F R T合成DNAのXhoI消化断片側が結合する。次いで、反応液を制限酵素SpeII 及びXhoIで同時に消化し、pBRFRTの両端に複数個結合する変異型F R T合成DNAを除いた後、未反応及び制限酵素消化された変異型F R T合成DNAをGEANCLEAN II (BI0101社製)により反応液から除き、片方の端に野生型F R T配列が、他方の端に変異型F R T配列が各1つ結合した直鎖状DNA (約4.1kb)を得る。

この断片と実施例2-(2)で調製したアデノウイルス5型ゲノムを制限酵素XhoIとXbaIとで同時に消化した約3.8kb とをライゲーションし、プラスミドpBfwtAxx (7.9kb、第6図)を得る。なお、プラスミドpBfwtAxxは上記方法により構築した一連のプラスミドの総称で、実際には第2図に示した変異型F R T配列と野生型F R T配列とを各1つずつ有する個々のプラスミドのことである。

プラスミドpBfwtAxxを制限酵素DraIで消化し、次に示すF L P依存DNA組換え反応の基質DNAとして用いる。

## (3) 野生型F R T配列と変異型F R T配列との間でのF L P依存DNA組換え反応

前述した基質DNAを実施例3で示した反応液に加え、30℃で30分F L P依存

組換え反応を行なう。反応終了後のDNAを精製し、制限酵素NcoI消化後アガロースゲル電気泳動を行ない、EtBr染色により検出されるDNAのバンドを解析する。

基質DNAには、制限酵素NcoIサイトが1か所のみ存在するので、FLPによる組換え反応を行なわないDraI消化済みの基質DNA(7.2kbと0.7kb)を制限酵素NcoI消化すると、5.9kb断片、1.3kb断片に0.7kbを加えた3本のバンドが生じる。一方、基質DNAがFLPにより組換え反応を起こすと、FRT配列を1個有する約3.8kbの環状DNAとFRT配列を1個有する約3.4kbの直鎖状DNAが生じるので、これらを制限酵素NcoI消化すると3.8kb、3.4kbに0.7kbを加えた3本のバンドが生じる(第7図参照)。従って、3.8kb及び3.4kbのバンドはFLPによる組換え反応が起きたことを示し、5.9kb及び1.3kbのバンドはFLPによる組換え反応が置き換えていないことを示すので、これらのバンドの量比により組換え効率が示される。

## 実施例5

<野生型FRT配列と変異型FRT配列との間でのFLP依存DNA組換え反応>

(1) 野生型FRT配列と変異型FRT配列とを含むプラスミドの構築並びに基質DNAの調製

34bpの野生型FRT配列を含む54塩基の合成DNA(配列番号:33)及びその相補鎖をプラスミドpUC18のSmaI部位に挿入して、野生型FRT配列が同方向に2個挿入され、かつ2個の野生型FRT配列間にSwaI部位を有したプラスミドpUFwF(2.8kb、第8図中のA)を得た。

プラスミドpCALNLZ(Y. Kanegae et. al., Gene, Vol.181, 207-212 (1996))をMluI及びXhoIで消化後平滑化したネオマイシン耐性遺伝子とSV40のポリA配列とを含む断片を得た。ついで前記ネオマイシン耐性遺伝子とSV

40のポリA配列を含む断片とをpUFWFのSwa I部位に挿入し、プラスミドpU  
FNF (3.9kb、第8図中のB)を得た。

プラスミドpCALNLw (Kanegae Y. et. al., Gene, Vol.181, 207-212 (1996))  
のSwa I部位に27塩基の合成ポリリンカー(5'-AAA TTG AAT TCG AGC TCG GT  
A CCC GGG-3'、配列番号: 34)及びその相補鎖を挿入し、プラスミドpCALNL5  
(6.1kb、第8図中のC)を得た。次いで、pUFNFをBamH I及びA sp 718  
で消化後平滑化したFRT配列/ネオマイシン耐性遺伝子/SV40のポリA配  
列/FRT配列を含む約1.2kbの断片を得た。前記約1.2kbの断片と、  
pCALNL5をMlu I及びXho Iで消化後平滑化したCAGプロモーターを含む  
約4.9kbの断片とを連結し、プラスミドpCAFNF5 (6.1kb、第8図中のD)を得た。  
pCAFNF5は、野生型FRT配列とグロビンポリA配列との間にcDNA挿入用  
のポリリンカー(Swa I-EcoR I-Sca I-Kpn I-Sma I部位)  
を有する。

プラスミドpCAFNF5をSal I及びPvu IIで消化後、末端を平滑化  
し、さらに自己ライゲーションさせ、〔プロモーター-野生型FRT配列-ネオ  
マイシン耐性遺伝子の一部〕を除いたプラスミドpdNF (4.1kb、第8図中のE)  
を得た。

実施例2で作製した、二つの同じ配列の変異型FRT配列を有するプラスミド  
pBxxAxx (xxはf72、f2161、f2262もしくはF3のいずれか)をBspE I及び  
Aat IIで同時に消化し、変異型FRT配列を有する約50bpの断片(a)を得  
た。一方、プラスミドpdNFをBspE I及びAat IIで同時に消化し、野生型  
FRT配列を含まない断片(b)を得た。前記(a)及び(b)の両断片をライ  
ゲーションし、pdNFの野生型FRT配列を変異型FRT配列に置換したプラスミ  
ドpdNmF (4.1kb、第8図のF)を得た。

緑色蛍光タンパク質(GFP)の変異体をコードするDNAが挿入された市販発現  
プラスミドpEGFP-C1 (4.7kb、CLONTECH社製)の、GFP遺伝子の3'末端とポリA

配列との間に存在するマルチクローニングサイト中のB g l I I 部位とX h o I 部位との間に、両端がB g l I I 部位並びにX h o I 部位であり、かつ内部に連続した二つの終止コドンを含むように設計した下記の18塩基の合成DNAリンカー：

5'-GATCTTACTAGTAGGATC-3' (配列番号：35)

3'-AATGATCATCCTAGAGCT-5' (配列番号：36)

を挿入し、プラスミドpEGFP-s (4.7kb) を得た。

プラスミドpEGFP-s をA g e I 及びX h o I で同時に消化し、さらにKlenow酵素で両端を平滑化して、GFP 遺伝子全長を含む約0.8kb のDNA断片(a)を得た。また、アデノウイルスE 1 及びE 3 遺伝子以外のアデノウイルス5型ゲノムの大部分を含み、かつE 1 遺伝子欠失部位にC A Gプロモーターが挿入されたコスミドベクターpAxCawt (Kanegae Y. et. al., Nucleic acid Res., Vol.23, 3816-3821 (1995)) には、プロモーターとポリA配列との間にC l a I 部位-S w a I 部位-C l a I 部位の順にクローニング部位が存在する。そこで、pAxCawt をS w a I 消化した後、前述した約0.8kb のDNA断片(a)を連結しコスミドベクターpAxCAGFPを得た。

pAxCAGFPをS a l I 消化後、自己ライゲーションさせ、アデノウイルスDNAの大部分を除いた(左端約0.4kbは含む)プラスミドpxCAGFP (6.1kb、第8図中のG)を得た。pxCAGFP はGFP 遺伝子の両端にC l a I 部位が存在するので、pxCAGFP をC l a I 消化した後、Klenow酵素で両端を平滑化したGFP 遺伝子全長を含む約0.8kb のDNA断片を得た。この断片を前述したプラスミドpCAFNF5のポリリンカー中のS m a I 部位に挿入し、プラスミドpCAFNF5 (6.9kb、第8図中のH)を得た。

最後に、プラスミドpCAFNF5 のC s p 4 5 I 部位からE c o R I 部位間と、プラスミドpdNmF のC s p 4 5 I 部位からE c o R I 部位間とを置換し、最終的な目的プラスミドpCAFNmFG (6.9kb、第8図中のI)を得た。プラスミドpCAFNmFG

は野生型F R T配列と変異型F R T配列とを各1つずつ含む一連のプラスミドの総称である。前記pCAFNmFGは、実際にはf72、f2161、f2262 もしくはF3のいずれかの変異型F R T配列 (mF) を含んでいる。

これらのプラスミドpCAFNmFGもしくは二つの野生型F R T配列を含むプラスミドpCAFNFG を制限酵素H i n d I I Iで消化して直鎖状DNAとした後、次に示すF L P依存組換え反応の基質DNAとして用いた。

## (2) 野生型F R T配列と変異型F R T配列との間でのF L P依存DNA組換え反応

終濃度50mMトリス塩酸(pH7.5) / 10mM MgCl<sub>2</sub> / 5mM DTT を含む緩衝液に、前述した基質DNA 1 $\mu$ gと実施例1で調製したF L Pを含む細胞抽出液25 $\mu$ lとを加え(反応液量50 $\mu$ l)、30°Cで30分反応した。反応終了後、反応液に200 $\mu$ lの滅菌水及び50 $\mu$ lの20mM EDTA 溶液(pH8.0)を加え、フェノール/クロロホルム抽出並びにクロロホルム抽出を行ない、さらにエタノール沈殿した。得られたDNAを、RNaseA (20 $\mu$ g/ml)を含むTEバッファー (pH8.0) 20 $\mu$ lに溶解した。次いで、その全量を制限酵素F s p Iで消化し、アガロースゲル電気泳動後、臭化エチジウム (EtBr) 染色により検出されたDNAのバンドを解析した。

H i n d I I I消化済みの基質DNAには制限酵素F s p I部位が二ヶ所存在し、F L Pによる組換え反応が起きない場合は、基質DNAを制限酵素F s p I消化すると2.8kb、2.4kb、1.8kbの3本のバンドが生じる。一方、基質DNAがF L Pにより組換え反応を起こすと、約5.7kbの直鎖状DNAと約1.2kbの環状DNAとが生じ、これらを制限酵素F s p I消化すると、3.9kb、1.2kb、1.8kbの3本のバンドが生じる(第9図)。従って、3.9kb及び1.2kbのバンドはF L Pによる組換え反応が起きたことを示し、2.8kb及び2.4kbのバンドはF L Pによる組換え反応が起きていないことを示すので、これらのバンドの量比により組み換え反応の効率が分かる。そこで、反応効率を数値化するため、反応後の

全DNA量に対する3.9kb のバンドの比を、二つのF R T配列間の組換え率（単位：％）として算出した。

本測定方法を用いて野生型F R T配列間の組換え率を求めると約28% であった。一方、野生型F R T配列と変異型F R T配列との間の組換え反応では、測定した全ての変異型F R T配列（f2161、f2262、f72 並びにF3）の組換え率は、検出限度以下（0.2%未満）であった。

本実施例並びに実施例3の結果より、本発明のf2161 及びf2262 の変異型F R T配列は、野生型F R T配列とは組換え反応が起きないが、同一配列の変異型F R T配列間では効率よく組換え反応が起きることが明らかになった。

#### 配列表フリーテキスト

配列番号：10は、合成DNAアダプターの配列である。

配列番号：11は、合成DNAアダプターの配列である。

配列番号：12は、野生型F R T配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：13は、野生型F R T配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：14は、変異型F R T配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：15は、変異型F R T配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：16は、変異型F R T配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：17は、変異型F R T配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：18は、変異型F R T配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチド



の配列である。

配列番号：19は、変異型F R T配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：20は、変異型F R T配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：21は、変異型F R T配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：22は、変異型F R T配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：24は、変異型F R T配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：25は、変異型F R T配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：26は、変異型F R T配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：27は、変異型F R T配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：28は、変異型F R T配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：29は、変異型F R T配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：30は、変異型F R T配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：31は、変異型F R T配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：32は、変異型F R T配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチド

の配列である。

配列番号：33は、FLP認識配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：34は、順にSwaI、EcoRI、ScaI、KpnI及びSmaIの認識配列を基にデザインしたオリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：35は、BglII認識配列、2つの終止コドン及びXhoI認識配列をコードする配列を基にデザインされたオリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号：36は、BglII認識配列、2つの終止コドン及びXhoI認識配列をコードする配列を基にデザインされたオリゴヌクレオチドの配列である。

#### 産業上の利用可能性

本発明の変異型FRT配列を含有したDNAは、リコンビナーゼFLPの存在下、野生型FRT配列とは組換え反応が起きないが、同一配列の2つの変異型FRT配列での組換え反応が起こるという優れた性質を発現する。したがって、高い効率の遺伝子置換方法が可能になるという優れた効果を奏する。さらに本発明DNAにより、野生型FRT配列と変異型FRT配列、又は異なる配列の変異型FRT配列を組み合わせ、動物細胞をはじめとする高等真核細胞における、効率の高い遺伝子置換方法が提供される。

## 請求の範囲

1. 酵母2ミクロンDNA由来の下記の野生型FRT配列（配列番号：1）：

5'-GAAGTTCCTATAC <sup>12345678</sup>TTTCTAGA GAATAGGAAGCTTC-3'  
スベーカー領域

において、中央部の 8 塩基（スパーサー領域）の塩基が下記（１）～（４）：

- (1) TCTCTGGA (f 2 1 6 1)  
 (2) TCTCCAGA (f 2 1 5 1)  
 (3) TATCTTGA (f 2 2 6 2) 及び  
 (4) TTTCTGGA (f 6 1)

からなる群より選ばれた配列の塩基に置換された配列を有する変異型FRT配列（それぞれ配列番号：2～5）を含有してなるDNA。

2. 請求項1に規定された変異型FRT配列において、スペーサー領域を除く領域において少なくとも1個の塩基の置換をさらに有する配列からなり、下記（A）及び（B）の性質を有する変異型FRT配列を含有してなるDNA：

(A) リコンビナーゼ FLP の存在下でも野生型 FRT 配列との間で特異的 DNA 組換え反応が起こらない、及び

(B) リコンビナーゼFLPの存在下、同一の配列を有するもう1つの変異型FRT配列との間で特異的DNA組換え反応が起こる。

3. リコンビナーゼFLPの存在下でも、異なる配列を有するもう1つの変異型FRT配列との特異的DNA組換え反応が起こらない、請求項1又は2記載の変異型FRT配列を含有してなるDNA。

4. 少なくとも1つの野生型FRT配列と少なくとも1つの請求項1～3いずれ

れかに規定された変異型F R T配列とを含有してなるDNA。

5. 野生型F R T配列と変異型F R T配列との間に所望の遺伝子を有してなる請求項4記載のDNA。

6. 互いに異なる配列をもつ少なくとも2つの請求項3に規定された変異型F R T配列を含有してなるDNA。

7. 互いに異なる配列をもつ2つの変異型F R T配列の間に所望の遺伝子を有してなる請求項6記載のDNA。

8. 請求項4～7いずれかに記載のDNAにより形質転換された細胞。

9. 下記のDNA (a) 及びDNA (b) をリコンビナーゼF L Pの存在下に反応させ、下記のDNA (c) を得ることを特徴とする遺伝子置換方法：

DNA (a) : 野生型F R T配列、遺伝子A及び請求項1～3いずれかに記載の変異型F R T配列をこの順に有するDNA；

DNA (b) : 野生型F R T配列、遺伝子B及びDNA (a) と同じ変異型F R T配列をこの順に有するDNA；

DNA (c) : DNA (a) において、遺伝子Aが遺伝子Bに置換されたDNA；

ここで、遺伝子A及び遺伝子Bは互いに異なる任意の遺伝子である。

10. 下記のDNA (d) 及びDNA (e) をリコンビナーゼF L Pの存在下に反応させ、下記のDNA (f) を得ることを特徴とする遺伝子置換方法：

DNA (d) : 互いに異なる配列をもつ2つの請求項3に規定された変異型F R

T配列（それぞれ変異型F R T配列 1 及び変異型F R T配列 2 という）及び遺伝子Aを変異型F R T配列 1、遺伝子A及び変異型F R T配列 2 の順に有するDNA；

DNA（e）：変異型F R T配列 1、遺伝子B及び変異型F R T配列 2 をこの順に有するDNA；

DNA（f）：DNA（d）において、遺伝子Aが遺伝子Bに置換されたDNA；

ここで、遺伝子A及び遺伝子Bは互いに異なる任意の遺伝子である。

1 1. 遺伝子Bが機能的な遺伝子ではないことを特徴とする、請求項 9 又は 1 0 記載の方法。

1 2. 遺伝子Aが機能的な遺伝子ではないことを特徴とする、請求項 9 又は 1 0 記載の方法。

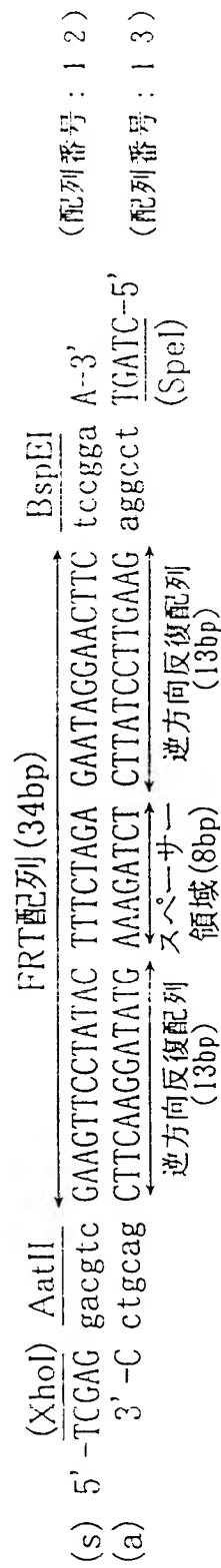
1 3. DNA（a）若しくはDNA（d）が細胞の染色体DNAであり、DNA（b）若しくはDNA（e）がプラスミドDNA又は二本鎖環状DNAウイルスのDNAである、請求項 9 ～ 1 2 いずれかに記載の方法。

1 4. DNA（a）若しくはDNA（d）が細胞の染色体DNAであり、DNA（b）若しくはDNA（e）が細胞内で変換されることにより二本鎖環状DNAとなる性質を有する、請求項 9 ～ 1 2 いずれかに記載の方法。

1 5. DNA（a）若しくはDNA（d）が二本鎖DNAウイルスの染色体DNAであり、DNA（b）若しくはDNA（e）がプラスミドDNA又は二本鎖環状DNAウイルスのDNAである、請求項 9 ～ 1 2 いずれかに記載の方法。



第 1 図







## 第 2 図

## センス鎖

123456 78

wtFRTs	5'-TCGAGGACGT	CGAAGTTCCT	ATACTTTCTA	GAGAAATAGGA	ACTTCTCCGG	AA-3'	(配列番号: 12)
f22s	5'-TCGAGGACGT	CGAAGTTCCT	ATACTATCTA	GAGAAATAGGA	ACTTCTCCGG	AA-3'	(配列番号: 14)
f61s	5'-TCGAGGACGT	CGAAGTTCCT	ATACTTTCTG	GAGAAATAGGA	ACTTCTCCGG	AA-3'	(配列番号: 15)
f72s	5'-TCGAGGACGT	CGAAGTTCCT	ATACTTTCTA	CAGAAATAGGA	ACTTCTCCGG	AA-3'	(配列番号: 16)
F3s	5'-TCGAGGACGT	CGAAGTTCCT	ATACTATTG	AAGAAATAGGA	ACTTCTCCGG	AA-3'	(配列番号: 17)
f2161s	5'-TCGAGGACGT	CGAAGTTCCT	ATACTTCTG	GAGAAATAGGA	ACTTCTCCGG	AA-3'	(配列番号: 18)
f2272s	5'-TCGAGGACGT	CGAAGTTCCT	ATACTATCTA	GAGAAATAGGA	ACTTCTCCGG	AA-3'	(配列番号: 19)
f2151s	5'-TCGAGGACGT	CGAAGTTCCT	ATACTCTCCA	GAGAAATAGGA	ACTTCTCCGG	AA-3'	(配列番号: 20)
f2262s	5'-TCGAGGACGT	CGAAGTTCCT	ATACTATCTT	GAGAAATAGGA	ACTTCTCCGG	AA-3'	(配列番号: 21)
f2373s	5'-TCGAGGACGT	CGAAGTTCCT	ATACTGTCTA	TAGAAATAGGA	ACTTCTCCGG	AA-3'	(配列番号: 22)

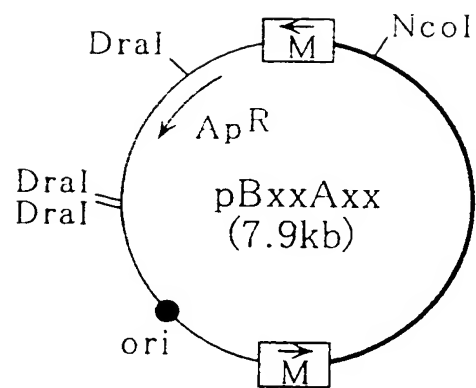
## アンチセンス鎖

876543 21

wtFRTa	5'-CTAGTTCGGG	AGAAGTTCCT	ATTCTCTAGA	AAGTATAGGA	ACTTCGACGT	CC-3'	(配列番号: 13)
f22a	5'-CTAGTTCGGG	AGAAGTTCCT	ATTCTCTAGA	TAGTATAGGA	ACTTCGACGT	CC-3'	(配列番号: 23)
f61a	5'-CTAGTTCGGG	AGAAGTTCCT	ATTCTCCAGA	AAGTATAGGA	ACTTCGACGT	CC-3'	(配列番号: 24)
f72a	5'-CTAGTTCGGG	AGAAGTTCCT	ATTCTGTAGA	AAGTATAGGA	ACTTCGACGT	CC-3'	(配列番号: 25)
F3a	5'-CTAGTTCGGG	AGAAGTTCCT	ATTCTTCAAA	TAGTATAGGA	ACTTCGACGT	CC-3'	(配列番号: 26)
f2161a	5'-CTAGTTCGGG	AGAAGTTCCT	ATTCTCAGA	GAGTATAGGA	ACTTCGACGT	CC-3'	(配列番号: 27)
f2272a	5'-CTAGTTCGGG	AGAAGTTCCT	ATTCTGTAGA	TAGTATAGGA	ACTTCGACGT	CC-3'	(配列番号: 28)
f2151a	5'-CTAGTTCGGG	AGAAGTTCCT	ATTCTCTGGA	GAGTATAGGA	ACTTCGACGT	CC-3'	(配列番号: 29)
f2262a	5'-CTAGTTCGGG	AGAAGTTCCT	ATTCTCAAGA	TAGTATAGGA	ACTTCGACGT	CC-3'	(配列番号: 30)
f2373a	5'-CTAGTTCGGG	AGAAGTTCCT	ATTCTATAGA	TAGTATAGGA	ACTTCGACGT	CC-3'	(配列番号: 31)

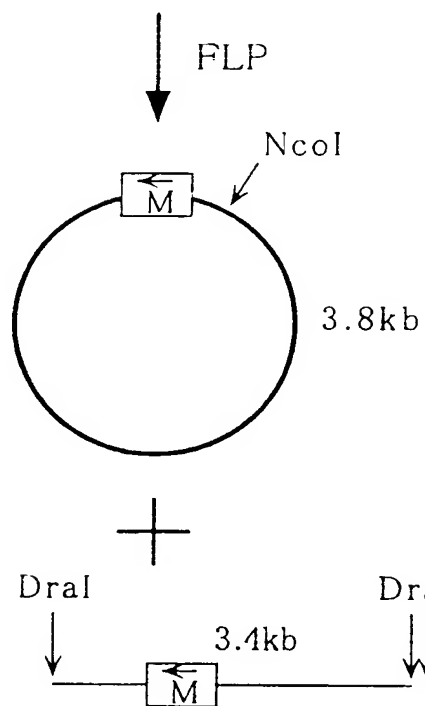
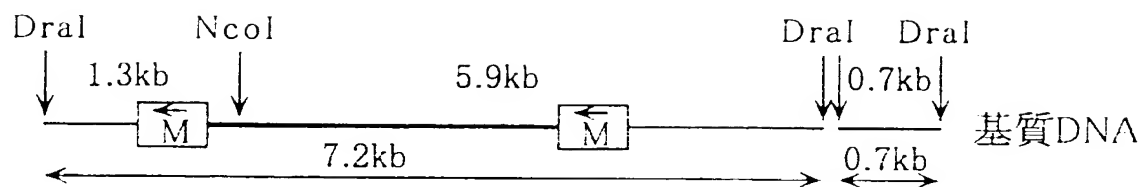


## 第 3 図



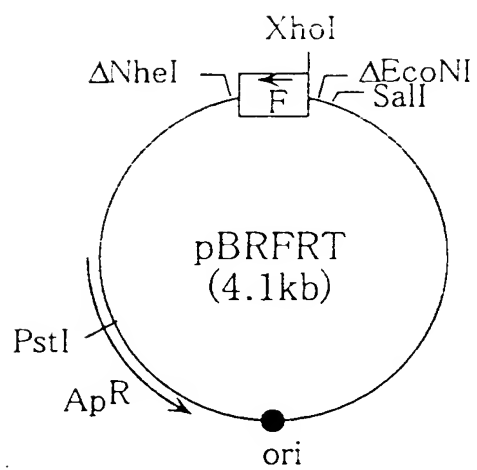


## 第 4 図





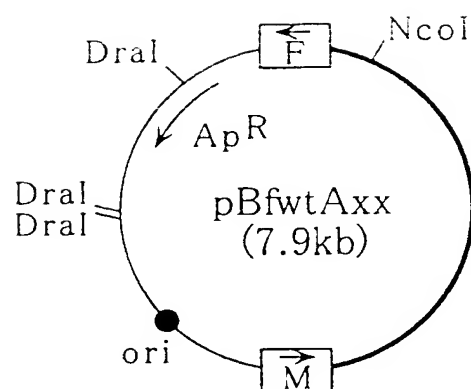
## 第 5 図





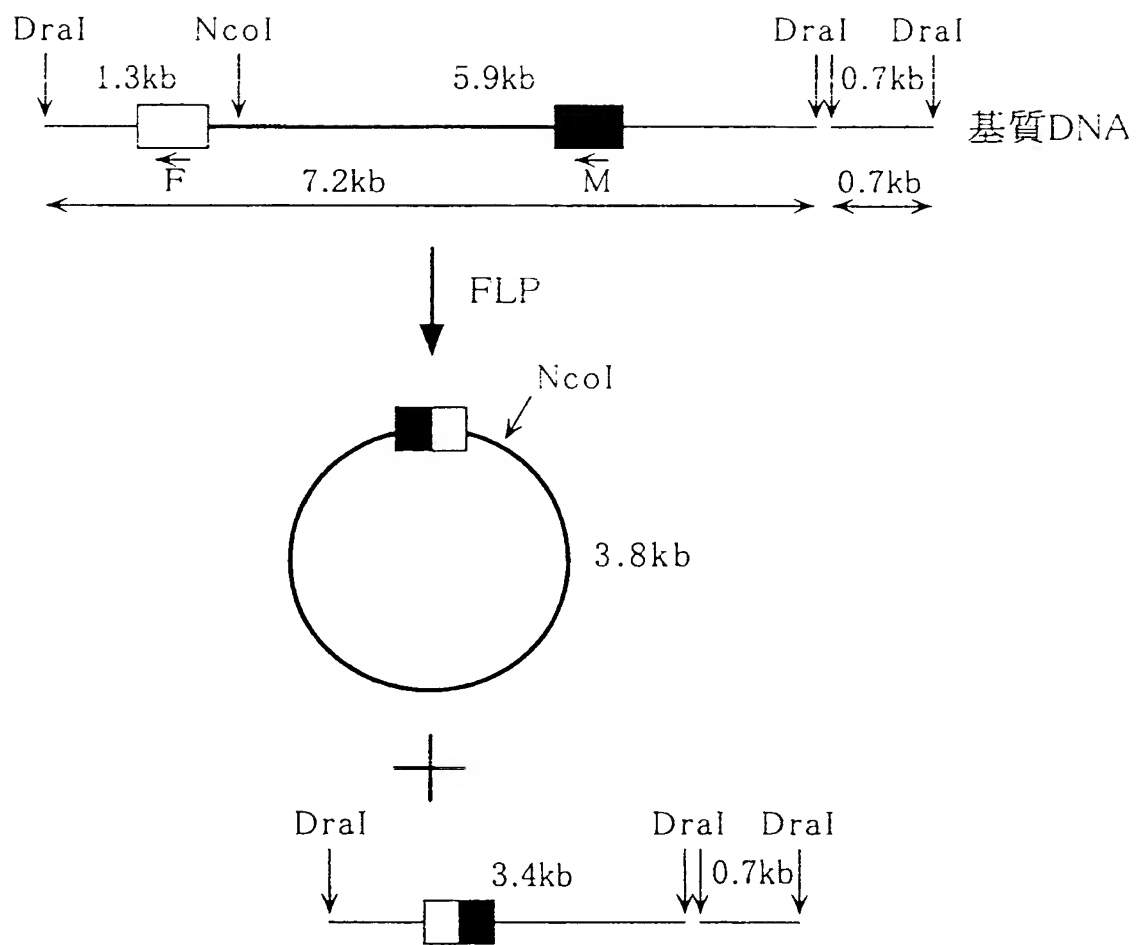


## 第 6 図



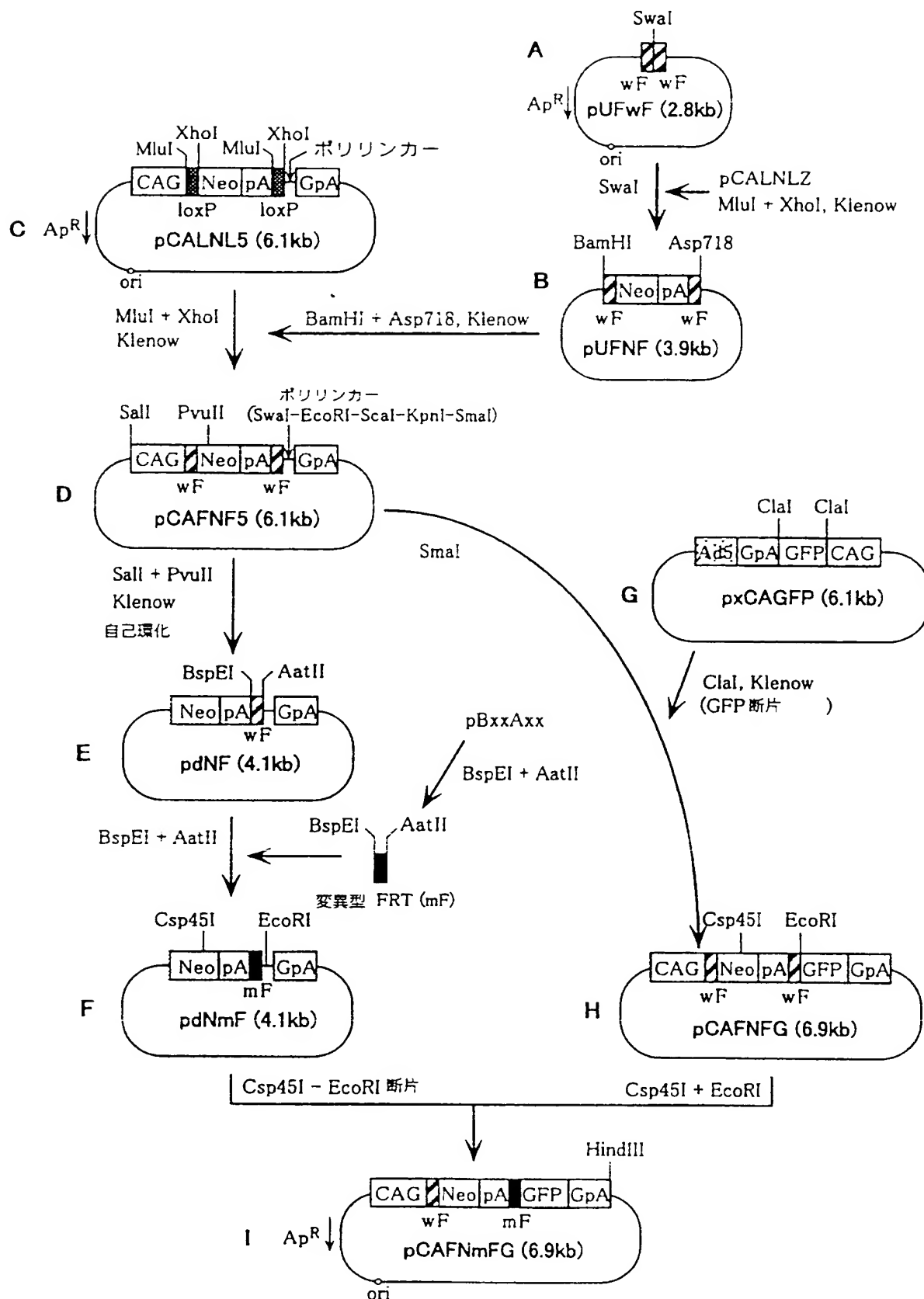


## 第 7 図



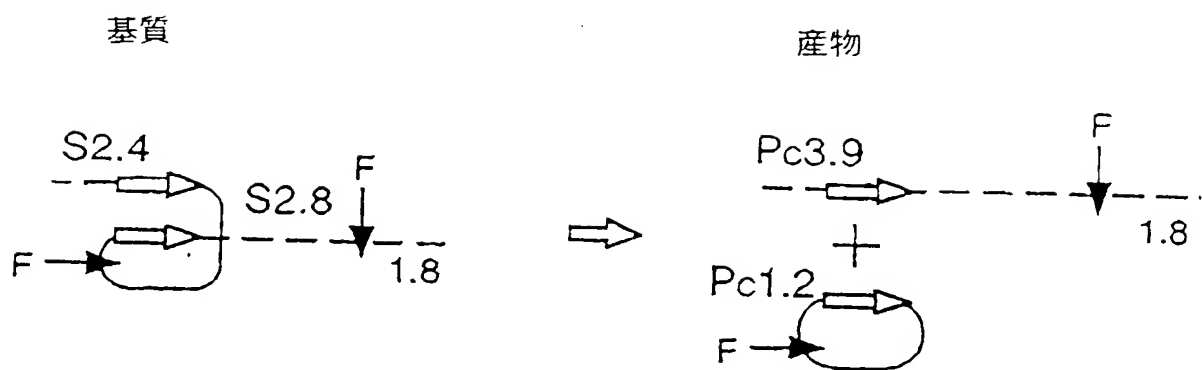


## 第 8 図





## 第 9 図







## SEQUENCE LISTING

<110> IZUMU SAITO

<110> SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY, LIMITED

<120> DNA comprising mutant FRT sequence

<130> 00-053-PCT

<150> JP 11-280210

<151> 1999-9-30

<150> JP 11-346727

<151> 1999-12-6

<160> 36

<210> 1

<211> 34

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 1

gaagttccta tactttctag agaataggaa cttc

34



<210> 2

<211> 34

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 2

gaagttccta tactctctgg agaataggaa cttc

34

<210> 3

<211> 34

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 3

gaagttccta tactctccag agaataggaa cttc

34

<210> 4

<211> 34

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 4

gaagttccta tactatcttg agaataggaa cttc

34

<210> 5

<211> 34



<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 5

gaagttccta tactttctgg agaataggaa cttc

34

<210> 6

<211> 34

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 6

gaagttccta tactatttga agaataggaa cttc

34

<210> 7

<211> 34

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 7

gaagttccta taccttgtga agaataggaa cttc

34

<210> 8

<211> 34

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*



<400> 8

gaagttccta tactatctac agaataggaa cttc

34

<210> 9

<211> 34

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 9

gaagttccta tactgtctat agaataggaa cttc

34

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> The oligonucleotide is synthesized DNA adaptor.

<400> 10

agcttctgca gcagaccgtg catcatg

27

<210> 11

<211> 19

<212> DNA





<213> Artificial Sequence

<220>

<223> The oligonucleotide is synthesized DNA adaptor.

<400> 11

atgcacggtc tgcigcaga

19

<210> 12

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on wild type FRT sequence.

<400> 12

tcgaggacgt cgaagttcct atactttcta gagaatagga acttctccgg aa

52

<210> 13

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on wild type FRT sequence.



<400> 13

ctagttccgg agaagttcct atttctctaga aagtatagga acttcgacgt cc 52

<210> 14

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 14

tcgaggacgt cgaagttcct atactatcta gagaatagga acttctccgg aa 52

<210> 15

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 15

tcgaggacgt cgaagttcct atactttctg gagaatagga acttctccgg aa 52



<210> 16

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 16

tcgaggacgt cgaagttcct atactttcta cagaatagga acttctccgg aa 52

<210> 17

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 17

tcgaggacgt cgaagttcct atactatttg aagaatagga acttctccgg aa 52

<210> 18

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 18

tcgaggacgt cgaagttcct atactctctg gagaatagga acttctccgg aa 52

<210> 19

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 19

tcgaggacgt cgaagttcct atactatcta cagaatagga acttctccgg aa 52

<210> 20

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.





<400> 20

tcgaggacgt cgaagttcct atactctcca gagaatagga acttctccgg aa

52

<210> 21

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 21

tcgaggacgt cgaagttcct atactatctt gagaatagga acttctccgg aa

52

<210> 22

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 22

tcgaggacgt cgaagttcct atactgtcta tagaatagga acttctccgg aa

52

<210> 23



<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 23

ctagttccgg agaagttcct attctctaga tagtatagga acttcgacgt cc 52

<210> 24

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 24

ctagttccgg agaagttcct attctccaga aagtatagga acttcgacgt cc 52

<210> 25

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 25

ctagttccgg agaagttcct attctgtaga aagtatagga acttcgacgt cc 52

<210> 26

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 26

ctagttccgg agaagttcct attcttcaaa tagtatagga acttcgacgt cc 52

<210> 27

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 27



ctagttccgg agaagttcct attctccaga gtagtatagga acttcgacgt cc

52

<210> 28

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 28

ctagttccgg agaagttcct attctgtaga tagtatagga acttcgacgt cc

52

<210> 29

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 29

ctagttccgg agaagttcct attctctgga gtagtatagga acttcgacgt cc

52

<210> 30

<211> 52





<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 30

ctagttccgg agaagttcct attctcaaga tagtatagga acttcgacgt cc 52

<210> 31

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 31

ctagttccgg agaagttcct attctataga cagtatagga acttcgacgt cc 52

<210> 32

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>



<223> Designed oligonucleotide based on mutant FRT sequence.

<400> 32

gaagttccta tactttctac agaataggaa cttc

34

<210> 33

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on FLP recognition sequence.

<400> 33

aaattccgga gaagttccta ttctctagaa agtataggaa cttcgacgtc attt

54

<210> 34

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide as polylinker based on recognition sequences of SmaI, EcoRI, ScaI, KpnI and SmaI, in this order.



<400> 34

aaattgaatt cgagctcggt acccggg

27

<210> 35

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide as linker based on sequence encoding BglI  
I recognition sequence, two stop codons, and XhoI recognition sequence.

<400> 35

gatcttacta gtaggatc

18

<210> 36

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide as linker based on sequence encoding BglI  
I recognition sequence, two stop codons, and XhoI recognition sequence.



<400> 36

tcgagatcct actagtaa

18





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06686

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/11, C12N15/10, A01K67/027, A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/11, C12N15/10, A01K67/027, A61K48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Seibler J. et al., "Double-reciprocal crossover mediated by FLP-recombinase: a concept and an assay.", Biochemistry, Vol.36, No.7 (1997) pp.1740-1747	1-20
A	Schlake T. et al. "Use of mutated FLP recognition target (FRT) sites for the exchange of expression cassette at defined chromosomal Loci", Biochemistry, Vol.33 (1994) pp.12746-12751	1-20
A	Seibler J. et al., "DNA cassette exchange in ES cells mediated by FLP recombinase: An efficient strategy for repeated modification of tagged Loci by marker-free constructs", Biochemistry, Vol.37 (1998), pp.6229-6234	1-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
19 December, 2000 (19.12.00)Date of mailing of the international search report  
30 January, 2001 (30.01.01)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> C12N15/11, C12N15/10, A01K67/027, A61K48/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> C12N15/11, C12N15/10, A01K67/027, A61K48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Seibler J. et al. "Double-reciprocal crossover mediated by FLP-recombinase: a concept and an assay." Biochemistry, 第36巻 第7号 (1997) p. 1740-1747	1-20
A	Schlake T. et al. "Use of mutated FLP recognition target (FRT) sites for the exchange of expression cassette at defined chromosomal Loci" Biochemistry 第33巻 (1994) p. 12746-12751	1-20
A	Seibler J. et al. "DNA cassette exchange in ES cells mediated by FLP recombinase: An efficient strategy for repeated modification of tagged Loci by marker-free constructs" Biochemistry 第37巻 (1998) p. 6229-6234	1-20

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19.12.00

国際調査報告の発送日

30.01.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加藤 浩

印

4B

9050

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

